

München, 1960.

Über die Isolierung
blutgruppenspezifischer Antigene
der Rindererythrocyten

Helga Beuche

Aus dem Tierärztlichen Institut der Universität Göttingen

Direktor: Professor Dr. E. Mitscherlich

Vorgelegt vom:

Tierhygienischen Institut der Tierärztlichen Fakultät

der Ludwig-Maximilians-Universität München

Vorstand: Professor Dr. A. Meyn

ÜBER DIE ISOLIERUNG BLUTGRUPPENSPEZIFISCHER
ANTIGENE DER RINDERERYTHROCYTEN

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der veterinär-medizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität
München

von

Helga Beuche

Tierärztin aus Königsberg/Pr.

München 1960

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Universität München

Dekan: Professor Dr. K. Zipf
Referent: Professor Dr. A. Meyn

Tag der Promotion: 26. Februar 1960

UNI-Druck, München 13, Amalienstraße 85

M e i n e n E l t e r n



INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
I. Einleitung	1
II. Schrifttum der bisherigen Untersuchungen	2
1.) Zur Gewinnung blutgruppenspezifischer Substanzen aus Zellen und Körperflüssigkeiten menschlicher und tierischer Herkunft	2
2.) Zur Prüfung der isolierten Substanzen	3
3.) Zur Haptenaktivierung	5
4.) Zur Gewinnung spezifischer Immunsere	6
5.) Zur Prüfung der Immunantikörper	6
III. Eigene Untersuchungen	8
A. Material	8
B. Methoden	9
1.) Ausführung der serologischen Reaktionen	9
a) Hemmungstest	9
b) Flockungsreaktion	10
c) Haemolysetest	11
d) Prüfung der Immunsere an 30 Standard- Erythrocyten	12
e) Absorptionsversuch	12
2.) Herstellung von Testseren durch Immunisierung von Kaninchen und Schafen mit antigenhaltigen Lösungen	13
a) Aufschluß von Erythrocytensediment bzw. Erythrocytenstroma durch die Behandlung mit Phenol	14
1) Versuche in Anlehnung an die Methode von Mitscherlich und Liess	14
11) Herstellung antigenhaltiger Lösungen	14
12) Herstellung spezifischer Antiseren durch Immunisierung von Kaninchen mit anti- genhaltigen Lösungen	25
13) Diskussion	31
2) Versuch nach der Methode von Morgan und Partridge	32

	Seite
3) Versuch nach der Kältemethode von Westphal, Lüderitz und Biester	32
4) Versuch nach der Wärmemethode von Westphal, Lüderitz und Biester	32
b) Aufschluß von Erythrocytenstroma durch fraktionierte Alkoholextraktion nach Hallauer	33
c) Aufschluß von Erythrocytenstroma durch Fermentbehandlung	33
1) Aufschließung mit Trypsin	33
11) Herstellung antigenhaltiger Lösungen	33
12) Herstellung spezifischer Antiseren durch Immunisierung von Kaninchen mit antigenhaltigen Lösungen	40
2) Aufschließung mit Papain	42
21) Herstellung antigenhaltiger Lösungen	42
3) Aufschließung mit Pepsin	43
31) Herstellung antigenhaltiger Lösungen	43
32) Herstellung spezifischer Antiseren durch Immunisierung von Kaninchen mit der Lösung Nr. 29	44
d) Kombinierte Extraktion und Digestion. Aufschluß von Erythrocytenstroma durch die Behandlung mit Petroläther, Pepsin und Aceton	46
1) Herstellung antigenhaltiger Lösungen	46
2) Herstellung spezifischer Antiseren durch Immunisierung von Kaninchen und Schafen mit den antigenhaltigen Fraktionen I bis III des Erythrocyten 132	52
3) Herstellung spezifischer Antiseren durch Immunisierung von Kaninchen und Schafen mit den antigenhaltigen Fraktionen I bis IV des Erythrocyten 369	56

	Seite
4) Herstellung spezifischer Antiseren durch Immunisierung von Kaninchen mit den antigenhaltigen Fraktionen I bis IV des Erythrocyten 243	59
5) Zusammenfassung der Ergebnisse aus den Versuchsreihen 1 - 3, (5. bis 7. Immunisierungsversuch)	61
IV. Diskussion	62
V. Zusammenfassung	66
VI. Literaturverzeichnis	68
VII. Anhang - Tabellen	75
Lebenslauf	90



Digitized by the Internet Archive
in 2026

I. EINLEITUNG

Ein wesentliches Problem in der Rinderblutgruppenserologie besteht darin, spezifische Testseren zu gewinnen. Die natürlichen Antiseren des Rindes erfassen nur einen Teil der über 40 Blutgruppenfaktoren. Ihre Auffindung setzt umfangreiche Untersuchungen voraus. Den Hauptanteil stellen die auf dem Wege der Immunisierung gewonnenen Faktorenseren. Als Spender dieser Immunantiseren kommen außer Rindern auch Schafe und Kaninchen in Betracht. Die Möglichkeiten bei der Isoimmunisierung sind dadurch begrenzt, daß für die Produktion eines Monofaktorenserums nur solche Tiere gewählt werden können, die den als Antigen gewünschten Blutgruppenfaktor nicht besitzen, so daß aus einer Vielzahl von Tieren nur einzelne Individuen für die Bildung dieses homologen Antikörpers geeignet sind. Bei der Heteroimmunisierung ist eine derartige Selektion nur von geringer Bedeutung, es zeigt sich hier jedoch, daß nicht nur die blutgruppenspezifischen Substanzen, sondern auch das artfremde Eiweiß des Rindes als Antigen empfunden wird und die Herstellung reiner Antifaktorenseren erschwert. Es erschien aus den angeführten Gründen wünschenswert, den Versuch zu unternehmen, die blutgruppenspezifischen Antigene vom arteigenen Protein des Rindererythrocyten soweit wie möglich zu trennen. Auf diesem Wege sollte ein Immunisierungsmaterial gewonnen werden, daß eine Produktion spezifischer Antifaktorenseren in der Heteroimmunisierung ermöglicht.

II. SCHRIFTTUM DER BISHERIGEN UNTERSUCHUNGEN

1.) Zur Gewinnung blutgruppenspezifischer Substanzen aus Zellen und Körperflüssigkeiten menschlicher und tierischer Herkunft

Die Isolierung lysinogener Substanzen vom Erythrocyten des Rindes gelang Bang und Forssmann (2) durch die Aetherextraktion unvorbehandelter Blutkörperchen und hämoglobinfrei gewaschener Stromata. Von anderen Autoren (7) wurden diese Befunde bestätigt und mit Hilfe der Acetonpräzipitation verschieden stark antihämolytisch wirkende Fraktionen aus den Extrakten hergestellt. In umfassenden Untersuchungen fanden Landsteiner und van der Scheer (24) bei engverwandten Tierarten, deren Proteine durch die Präzipitation nicht zu unterscheiden waren, Antigendifferenzen in den alkoholischen Erythrocytenextrakten und durch zahlreiche weitere Versuche (8, 9, 13, 15, 40, 51, 52) wurde das Vorhandensein blutgruppenspezifischer Stoffe in den alkoholischen Auszügen menschlicher Blutkörperchen nachgewiesen. Brahn und Schiff (3) stellten nicht nur in dem alkoholischen Auszug, sondern auch in dem mit Alkohol und Aether extrahierten Rückstand der Erythrocyten blutgruppenspezifische Substanzen fest und nahmen in Übereinstimmung mit Landsteiner und van der Scheer (24) als Grundlage der Gruppenspezifität nicht eine einheitliche Substanz, sondern zwei verschiedene Stoffe, einen in der Lipoid- und einen in der Proteinfraction enthaltenen an. - Über die Gewinnung spezifischer Substanzen aus einer, nach der Methode von Bennett und Schmidt (5) hergestellten stromafreien, wäßrigen Lösung von Erythrocyten verschiedener Tierarten berichten Schmidt und Dement (43). Hallauer (16, 17) konnte wasserlösliche Blutgruppenstoffe aus erschöpfend mit Alkohol extrahierten Blutkörperchen isolieren und Kossjakow (23) fand die Träger der Gruppenspezifität in lipoid- und eiweißfreien Präparaten menschlicher Erythrocyten. - Eine Möglichkeit, blutgruppenspezifische Stoffe aus Geweben zu isolieren, sieht Kabat (22) in der enzymatischen Hydrolyse. Er weist jedoch darauf hin, daß durch die Anwendung von Pepsin oder anderen Fermenten bei der Digestion artfremden Materials blutgruppenspezifische Substanzen als "Verunreinigungen" auftreten können, zumal nach Angaben verschiedener Autoren (4, 27, 30, 41) in einigen Handelspräparaten von Schweinemagenpepsin Verbindungen mit blutgruppenspezifischer Aktivität nachgewiesen werden konnten. Nach Ansicht von Jorpes und Norlin (21) ist dagegen die enzymatische Proteolyse zur Gewinnung blutgruppenspezifischer Substanzen ungeeignet, nachdem sie den fermentativen Abbau der Blutgruppeneigenschaften in Harnpräparaten bei ihren Versuchen mit Trypsin und Papain fest-

stellten. - Morgan (33) verwendete als eiweißlösendes Agens starke Phenollösungen und gewann nach diesem Verfahren aus Schweinemagenschleimhaut Präparate mit kräftiger A-Gruppenspezifität.

Um die Schädigung der Antigene bei der Isolierung durch chemische Mittel zu verhindern, wurde von einigen Autoren die Anwendung physikalischer Methoden vorgezogen. Die Herabsetzung des Agglutinationsvermögens menschlicher Erythrocyten durch wiederholtes Waschen mit physiologischer Kochsalzlösung (44) und das Übergehen der blutgruppenspezifischen Stoffe in die Waschwässer wurde von Hallauer (17) mehrfach bestätigt. - Durch hochtouriges Zentrifugieren hämoglobinfreien Stromas konnten, unter Berücksichtigung bestimmter pH-Gehalte, zwei Fraktionen mit unterschiedlicher Blutgruppenspezifität getrennt werden (6) und in elektrophoretischen Versuchen mit Stromaextrakten menschlicher Erythrocyten gelang die Markierung der A- und B-Substanzen (37).

2.) Zur Prüfung der isolierten Substanzen

Die Prüfung der nach verschiedenen Methoden hergestellten Präparate auf ihren Gehalt an blutgruppenspezifischen Stoffen kann im serologischen Test oder durch den chemischen Nachweis erfolgen. Die Flockungsreaktion (15, 22, 25, 42) und die Komplementbindung (3, 8, 9, 10, 15, 30) mit spezifischen Immunsereen dienen dem Nachweis korrespondierender Antigene in alkoholischen Blutkörperchenextrakten. Witebsky und Okabe (52) stellten bei diesen Versuchen Reaktionsunterschiede zwischen normalen Isoantikörpern und Immunantikörpern fest. Mit Hilfe der Isopräzipitation (11) gelang die Bestimmung blutgruppenspezifischer Substanzen in wässrigen Stromataextrakten, während in zahlreichen anderen Untersuchungen (2, 6, 7, 13, 16, 17, 22, 23, 28, 30, 38) die Neutralisierung blutgruppenspezifischer Antikörper im Hemmungstest zur Identifizierung des isolierten Materials herangezogen wurde. Bang und Forssmann (2) kamen bei einem Vergleich der Extraktwirkung auf verschiedene Immunsereen zu der Feststellung, daß die durch Blutkörpercheninjektion erzeugten Antikörper des Kaninchens - im Gegensatz zu den Extraktantikörpern - nicht neutralisiert wurden und in den Versuchen von Dautwitz und Landsteiner (7, 24), durch welche diese Angaben bestätigt wurden, zeigten sich bei einem Vergleich von Normal- und Immunsereen ebenfalls unterschiedliche Reaktionen im Hemmungstest, obwohl sich das in den Seren enthaltene Lysin als identisch erwiesen hatte. - Über die Brauchbarkeit des Absorptionsversuches zum Spezifitätsbeweis des gewonnenen Materials berichten Witebsky und Okabe (52), zumal es ihnen bei der Anwendung dieser Methode gelang, die durch Komplementbindung nicht nachweisbaren Beziehungen zwischen normalen Isoantikörpern und den alko-

holischen Extrakten korrespondierender Gruppen nachzuweisen.

Die im Reagenzglas dargestellte Spezifität der isolierten Substanzen kann nicht in allen Fällen durch den Tierversuch bestätigt werden. Bang und Forssman (2) stellten bei ihren Untersuchungen die Verschiedenheit der neutralisierenden und immunisierenden Substanz fest. Witebsky (50) konnte nach Vorbehandlung mit alkoholischen Extrakten menschlicher Blutkörperchen keine Immunsereen von Kaninchen gewinnen. Dagegen ist aus Versuchen anderer Autoren (30, 31) bekannt, daß die Injektion alkoholischer Erythrocytenextrakte zwar zur Antikörperbildung beim Versuchstier führt, daß jedoch die antigene Wirksamkeit dieses Immunisierungsmaterials im Vergleich zu unvorbehandelten Blutkörperchen gering ist (7, 24, 25). Die Prüfung der nach Acetonbehandlung gewonnenen Substanzen im Tierversuch ergab, daß nur die acetonunlösliche, nicht aber die acetonlösliche Fraktion das Lysinogen enthält (2, 13, 42, 46). Die Produktion haemolyisierender Antikörper mit der wasserlöslichen Fraktion roter Blutkörperchen gelang in den Immunisierungsversuchen von Ford und Halsey (14) und Benett und Schmidt (5), während nach Berichten anderer Autoren (16, 23, 38) ein vollständiger Mangel antigenen Wirksamkeit bei den wasserlöslichen Blutgruppensstoffen vorliegt.

Die Frage nach der chemischen Natur der blutgruppenspezifischen Substanzen kann im serologischen Test nur in bezug auf ihren überwiegenden Gehalt an Lipiden (Flockungsreaktion, Komplementbindung) oder Eiweißstoffen (Präzipitation) beantwortet werden (3, 15, 47), chemische Nachweismethoden ermöglichen eine Aussage über das Vorhandensein von Proteinen, Kohlehydraten oder Lipiden (2, 21, 23, 46), erst durch die Analyse läßt sich jedoch die chemische Struktur der die Blutgruppenspezifität bestimmenden Substanzen ermitteln. Umfassende Untersuchungen der Stromaproteine wurden von Howe (18) durchgeführt. Es gelang hierbei die Trennung drei verschiedener Fraktionen, die nach ihrem Lipoidgehalt als lipoidreiche (LR), lipoidarme (LP) und lipoidfreie (LF) Fraktion bezeichnet wurden. Die Prüfung auf die Anwesenheit von Kohlehydraten und die Beurteilung der serologischen Spezifität ergab, daß die den Hauptanteil darstellende lipoid- und kohlehydratreiche (LR) Fraktion A-, B- und Rh-Aktivität zeigte, die lipoidarme (LP) im Vergleich zur lipoidreichen (LR) Fraktion einen geringeren Kohlehydratanteil besaß und nur A- und B-, jedoch keine Rh-Substanz enthielt und in der lipoidfreien (LF) Fraktion nur Spuren von Kohlehydraten festzustellen waren, während blutgruppenspezifische Antigene nicht

nachgewiesen werden konnten. Calvin und seine Mitarbeiter (6) erhielten bei ihren Versuchen zwei verschiedene Stromafractionen, eine - in Übereinstimmung mit Jorpes (20) - Stromatin genannte Proteinfraction und eine als Elinin bezeichnete Lipoproteinfraction. Die Rh-Substanz wurde nur im Elinin, welches auch die A- und B-Antigene in der 4 - 5fachen Konzentration gegenüber dem Stromatin enthielt, nachgewiesen. Takaki (46) fand bei der chemischen Analyse eines vom Erythrocyten gewonnenen Lysinogens Kohlenstoff, Wasserstoff und Stickstoff je nach Herstellungsart des Antigens in wechselndem Verhältnis und konnte daher die chemische Struktur der wirksamen Substanz nicht festlegen. Erst durch die Untersuchungen von Morgan (34) über die chemischen Grundlagen der Antigene des ABO- und Lewis-Blutgruppensystems ist bekannt, daß es makromolekulare Komplexe aus Kohlehydraten und Aminosäuren sind, welche die Gruppenspezifität bestimmen.

3.) Zur Haptenaktivierung

Nach einer von Landsteiner und van der Scheer (26) beschriebenen Methode ist es möglich, durch die Anlagerung chemischer Substanzen einfacher Struktur an Protein synthetische Antigene herzustellen, die beim Versuchstier zur Bildung von Immunseren führen, deren Spezifität durch die angelagerte Substanz bestimmt wird. Auf diese Art können chemische Verbindungen, die selbständig zur Antikörperbildung nicht fähig sind (Haptene) zu Antigenen komplettiert werden. Nach der von Sachs (39) durch zahlreiche Untersuchungen an alkoholischen Organextrakten entwickelten Schleppe-theorie hat sich artfremdes Eiweiß für die Haptenimmunisierung als geeignet erwiesen. Landsteiner und Simms (29) konnten durch Kombinationsimmunisierung mit Schweineserum beim Kaninchen Hapten-Antikörper erzeugen, während arteigenes Serum als unbrauchbar für die Haptenaktivierung erkannt wurde, da es nicht als Antigen empfunden wird (29, 39). Westphal und Reiche (49) verwendeten hochgereinigte A-Substanz nach Kupplung an Rinderserumglobulin oder Eialbumin zur Immunisierung beim Kaninchen und erhielten reine Anti-A-Seren mit hohem Titer. Goebel und Avery (1) nahmen als Eiweißkomponente für die Synthese eines Kohlehydrat-Protein-Antigens das durch Ammoniumsulfatpräzipitation gewonnene Pferdeserumglobulin. Doerr und Hallauer (9) weisen auf die Brauchbarkeit von bakteriellem Eiweiß für die Kombinationsimmunisierung hin.

Die Überführung von Kohlehydrat- oder Lipoidhaptenen in Vollantigene ist nicht nur durch Proteine möglich, sondern kann auch durch die Adsorption an inertes Material erreicht werden. Zozaya (53) stellte ein artifizielles

Antigen aus bakteriellem Kohlehydrat und Kollodium her. Plaut und Rudy (36) erhielten spezifische Immunsereen gegen ein Adsorbat von alkoholischem Rinderhirnextrakt und Aluminiumhydroxyd.

4.) Zur Gewinnung spezifischer Immunsereen

Die angeführten Verfahren ermöglichen es, die Spezifität einer selbständig nicht antigen wirkenden Substanz nicht nur im Reagenzglas, sondern auch im Tierversuch nachzuweisen. Zu berücksichtigen ist hierbei, daß ein Immuneserum nicht immer als vollständiges Abbild der Antigenstruktur zu werten ist, da einige Antikörper leicht und schnell entstehen, während andere selten oder von einem bestimmten Versuchstier gar nicht gebildet werden (19, 30). Über die Erzeugung spezifischer Seren durch Kombinationsimmunisierung beim Kaninchen - wobei sowohl artfremdes Eiweiß als auch inertes Material als Hapten-Träger diene - berichten zahlreiche Autoren (1, 9, 25, 36, 49, 51, 53). Die Spezifität dieser Seren, bestimmt durch vom Erythrocyten gewonnene Substanzen, wurde nicht nur im Agglutinations- und Haemolysetest geprüft, sondern auch in Vergleichsuntersuchungen mit solchen Seren beurteilt, deren Lysinogen sich infolge ihrer Einstellung auf das gleiche Substrat als identisch erwiesen hatten (Normalseren und Blutkörperchenimmunsereen).

5.) Zur Prüfung der Immunantikörper

Landsteiner und van der Scheer (25) weisen in ihrer Arbeit über die Flockungsreaktionen mit alkoholischen Erythrocytenextrakten darauf hin, daß, in ihrer haemolytischen Wirkung spezifische Seren, die durch Injektion einer Mischung von Alkohol- oder Äther-Pferdebloodextrakt mit verdünntem Schweineserum hergestellt worden waren, im Flockungstest mit den alkoholischen Extrakten verschiedener Blute reagierten. Die Ursache für diesen Spezifitätsmangel sahen sie im Schweineserumanteil des Immunisierungsmaterials, zumal sich einige reine Extraktseren auch in der Flockungsreaktion als spezifisch erwiesen hatten. In weiteren Untersuchungen kamen sie zu der Feststellung, daß Extraktimmunsereen außer den durch Absorption zu entfernenden Agglutininen und Haemolysinen noch solche Antikörper enthielten, die in der Flockungsreaktion wirksam waren und dabei Relationen zwischen entfernt verwandten Arten aufwiesen. Die Anwesenheit dieser Antikörper wurde von den genannten Autoren als Beweis für die Existenz heterogenetischer Antigene im Erythrocyten, die durch Alkohol extrahiert werden konnten, angeführt. Es wurde jedoch in diesen Untersuchungen in Übereinstimmung mit anderen Autoren (13, 15) nicht nur der

Nachweis heterogenetischer, sondern auch blutgruppenspezifischer Antikörper durch die Flockungsreaktion bestätigt. Witebsky (52) fand, daß die mit Extrakt aus menschlichen A-Erythrocyten hergestellten Kaninchenimmunsereen sowohl in der Flockungs- und Komplementbindungsreaktion mit diesen Extrakten, als auch bei der Absorption und im Agglutinations- und Haemolyse-test mit den korrespondierenden Erythrocyten spezifische Reaktionen zeigten. Im Gegensatz dazu standen die Versuchsergebnisse mit Extrakt-B-Antisereen, die zwar mit den homologen Extrakten positive Flockung und Komplementbindung geben, die Blutkörperchen dieser Gruppe jedoch weder agglutinierten noch haemolysierten. Ebenso wenig konnten die Blutkörperchen der Gruppe B die Antikörper dieser Extraktseren binden.

Bei einem Vergleich der Antikörper in Normal- und Immunsereen ergibt sich nach Greenfield (15), daß blutgruppenspezifische Agglutinine und Haemolysine in beiden Serumarten auftreten, komplementbindende gruppenspezifische Antikörper nur selten in Normalseren, häufig dagegen in Immunsereen nachgewiesen werden können und die flockenden Antikörper, die alkoholische Erythrocytenextrakte ausfällen, nur in Immunsereen vorkommen. Der Vergleich von Blutkörperchenimmunsereen mit Extraktimmunsereen zeigte, daß die Injektion unbehandelter Erythrocyten im Gegensatz zu den Extrakten nicht nur zur Bildung blutgruppenspezifischer Antikörper, sondern auch zur Produktion artspezifischer Antikörper führt (13). Bang und Forssmann (2) stellten bei spezifischen haemolysierenden Seren, die durch Blutkörpercheninjektion oder den daraus gewonnenen Extrakten hergestellt worden waren, ein unterschiedliches Verhalten der Antikörper im Hemmungstest fest.

Aus den Vergleichsuntersuchungen ist zu ersehen, daß die genannten drei Serumarten - Normalseren, Blutkörperchenimmunsereen und Extraktimmunsereen - neben den gemeinsamen Agglutininen und Haemolysinen auch noch solche Antikörper enthalten können, die bei Anwendung anderer serologischer Nachweismethoden Spezifitätsdifferenzen erkennen lassen.

III. EIGENE UNTERSUCHUNGEN

A. Material: Herstellung des Erythrocytensedimentes und des Erythrocyten- stromas

5 l Blut wurden in 1 l einer modifizierten Rous-Turner-Lösung (5 Teile 5,4 %ige Glukose + 3,8 %iges Na-Citrat, zu 6 Teilen dieser Lösung 0,1 Teil 10 %iges Formalin) aufgefangen. Die Erythrocyten wurden abzentrifugiert und so lange in physiologischer Kochsalzlösung gewaschen - etwa 5-6 mal - bis im Waschwasser mit der Sulfosalicylsäureprobe kein Eiweiß mehr nachweisbar war. Die nach dem letzten Zentrifugieren als Bodensatz verbleibenden Blutkörperchen stellten das Erythrocytensediment dar.

Das Erythrocytensediment wurde in der Tiefkühltruhe haemolysiert und nach dem Auftauen in einem Äther-Wasser-Gemisch (1 : 1) durch kräftiges Rühren und mehrfaches Umgießen aufgenommen. Diese Mischung wurde in großen Bechern 30 Min. bei 2 500 U./Min. zentrifugiert, wobei sich das noch stark hämoglobinhaltige Stroma an der Oberfläche absetzte und abgehoben werden konnte. Die Behandlung mit dem angegebenen Äther-Wasser-Gemisch wurde so oft wiederholt, bis das abzentrifugierte Wasser nur noch leicht haemolytisch war. Anschließend wurde das Stroma mehrfach in physiologischer Kochsalzlösung gewaschen und zentrifugiert, bis es sich nach Verdampfen des Äthers am Boden der Gefäße absetzte. Der grau-weiße Bodensatz wurde sowohl in ungetrockneter Form als Stroma I als auch in lyophilisierter Form als Stroma II verwandt.

Für die Petroläther-Extraktion wurde der Herstellungsgang in folgender Weise abgewandelt: Die aus der Rous-Turner-Lösung abzentrifugierten Erythrocyten wurden zweimal mit physiologischer Kochsalzlösung gewaschen und das Sediment anschließend in der Tiefkühltruhe haemolysiert. Die Behandlung mit dem angegebenen Äther-Wasser-Gemisch erfolgte ebenfalls nur zweimal und das stark ätherhaltige Stroma wurde bis zur Weiterverarbeitung eingefroren.

B. Methoden

1.) Ausführung der serologischen Reaktionen

a) Hemmungstest

Um das Immunisierungsmaterial (Dialysate, Fermentationslösungen, Extrakte) auf seinen Antigengehalt zu prüfen, sollte im Hemmungstest festgestellt werden, ob die in einem bekannten, inaktivierten Testserum vorhandenen Antikörper durch die Zugabe der zu prüfenden Lösung (Antigen) ganz oder teilweise neutralisiert wurden. Zur Durchführung des Tests wurden 0,1 ccm des betreffenden Testserums mit 0,1 ccm der zu prüfenden Lösung in ein Röhrchen pipettiert und 1 1/1 Std. bei Zimmertemperatur gehalten. Darauf wurden 0,05 ccm Kaninchenkomplement (unverdünntes, frisches oder in der Tiefkühltruhe aufbewahrtes Kaninchenserum) und 0,05 ccm einer 2,0 %igen Suspension des Erythrocyten hinzugefügt, aus dessen Sediment oder Stroma die zu prüfende Lösung gewonnen worden war.

Zu jedem Versuch wurden folgende Kontrollen angesetzt:

- 1.) Kontrolle der physiologischen Kochsalzlösung und des Erythrocyten (NaCl/Ery.): 0,15 ccm physiologische Kochsalzlösung + 0,05 ccm 2,0 %ige Erythrocytensuspension.
Eine Haemolyse darf nicht eintreten.
- 2.) Komplementkontrolle (Kpl.): 0,1 ccm physiologische Kochsalzlösung + 0,05 Erythrocytensuspension + 0,05 ccm Kaninchenkomplement.
Eine Haemolyse darf nicht eintreten.
- 3.) Kontrolle der zu prüfenden Lösung (Lsg): 0,15 ccm der zu prüfenden Lösung + 0,05 ccm Erythrocytensuspension.
Eine Haemolyse darf nicht eintreten.
- 4.) Testserumkontrolle: Sie diene der Kontrolle des Antikörpergehaltes (Aktivität) des nicht gehemmten Serums. 0,1 ccm Testserum (Gebrauchsverdünnung) + 0,05 ccm Erythrocytensuspension + 0,05 ccm Erythrocytensuspension + 0,05 ccm Kaninchenkomplement.
Es muß eine komplette Haemolyse eintreten.
- 5.) Spezifitätskontrolle der Hemmwirkung (Antigengehalt der zu prüfenden Lösung). Die zu prüfende Lösung (0,1 ccm) wurde mit Testseren (jeweils 0,1 ccm der Gebrauchsverdünnung) zusammengebracht, deren Antikörper nicht den Antigenen entsprachen, die in der Lösung vermutet wurden. Nach 1 1/2 stündigem Aufenthalt bei Zimmertemperatur wurden Kaninchenkomplement (0,05 ccm) und die 2,0 %ige Suspension eines Erythrocyten (0,05 ccm) hin-

zugefügt, der einen den Antikörpern des Testserums entsprechenden Blutgruppenfaktor besaß. Wurde die Haemolyse des Erythrocyten nach einem 3-stündigen Aufenthalt bei Zimmertemperatur beeinträchtigt, so mußte die Hemmwirkung der zu prüfenden Lösung als unspezifisch beurteilt werden. Die Spezifität der Hemmwirkung wurde in der angegebenen Weise in steigenden Verdünnungen (unverdünnt, 1:2, 1:4, 1:8 usw.) ausgetestet. Diese Kontrolle ist für die Immunisierungsversuche Nr. 5 bis 7 eingeschaltet. -

Die Ablesung erfolgte nach 3-stündigem Aufenthalt bei Zimmertemperatur. Die Beurteilung des Hemmungsgrades wurde nach dem unten angegebenen Schema vorgenommen.

Einheiten der Hemmungs- eigenschaft	Haemolyse- grad	
5	0	= alle Erythrocyten sind ungeschädigt. Die überstehende Flüssigkeit ist wasserklar.
4	sp	= Spur. Die Masse der Erythrocyten ist sedimentiert. Die überstehende Flüssigkeit ist schwach rötlich gefärbt.
3	1	= 75 % der Erythrocyten sind sedimentiert, 25 % haemolysiert.
2	2	= 50 % der Erythrocyten sind sedimentiert, 50 % haemolysiert.
1	3	= 25 % der Erythrocyten sind sedimentiert, 75 % haemolysiert.
0	4	= 100 % der Erythrocyten sind haemolysiert.

b) Flockungsreaktion

Ausgehend von der Tatsache, daß nach Einwirkung eines durch Vorbehandlung mit Lipoiden gewonnenen Immunserums auf eine Lipoidantigenaufschwemmung eine Flockung zustande kommt, sollte die Antikörperqualität der aus den Immunisierungsversuchen 5 bis 7 stammenden Seren im Flockungstest bestimmt werden. Als Antigen dienten die Stromafraktionen I b (Petroläther-Extrakt) und III b (Aceton-Extrakt) des Erythrocyten 243. Zur Durchführung des Tests wurden 0,5 ccm

des Antigenfiltrates + 0,05 ccm des zu prüfenden Serums in ein Röhrchen pipettiert. Zu jedem Versuch wurden folgende Kontrollen angesetzt:

- 1.) Antigenkontrolle: 0,5 ccm Antigenfiltrat + 0,05 ccm physiologische Kochsalzlösung. Eine Flockung durfte nicht eintreten.
- 2.) Lipoidantikörper-Kontrolle: Als Antigen wurde das Filtrat der Fraktion II b (Acetonpräzipitat) des Erythrocyten 243 verwendet. 0,5 ccm Antigenfiltrat + 0,05 ccm des zu prüfenden Immunserrums. Eine Flockung durfte nicht eintreten.

Die Ablesung erfolgte nach 12-stündiger Inkubation bei 37° C. Für den Flockungsgrad wurden die folgenden Bezeichnungen eingesetzt:

- | | |
|------|---|
| ++++ | = klare überstehende Flüssigkeit und große, weiße Flocken, die sich beim Aufschütteln nicht lösten. |
| +++ | = klare überstehende Flüssigkeit und große, weiße Flocken, die beim Aufschütteln zum Teil zerfielen. |
| ++ | = schwach getrübe überstehende Flüssigkeit und weiße Flocken, die beim Aufschütteln zum Teil zerfielen. |
| + | = stark getrübe überstehende Flüssigkeit und wenige kleine weiße Flocken. |
| - | = milchigtrübe überstehende Flüssigkeit und aufschüttelbares Sediment. |

c) Haemolysetest

Im Haemolysetest wurde die Antikörperspezifität geprüft. Sind die in einem Immunserrum enthaltenen Antikörper auf die Antigene bestimmter Erythrocyten eingestellt, so werden diese Blutkörperchen infolge der Antikörper-Antigen-Bindung nach Komplementzusatz haemolysiert. Zur Durchführung des Tests wurden in kleinen Röhrchen 0,1 ccm des zu prüfenden Serums mit 0,05 ccm einer 2,0 %igen Erythrocytensuspension versetzt. Anschließend wurden zu jedem Röhrchen 0,05 ccm Kaninchenkomplement (1 : 1 mit physiologischer Kochsalzlösung verdünntes frisches oder in der Tiefkühltruhe aufbewahrtes Kaninchen serum) hinzugefügt. Zu jedem Versuch wurden folgende Kontrollen angesetzt:

- 1.) Kontrolle der physiologischen Kochsalzlösung und des Erythrocyten (NaCl/Ery.): 0,15 ccm physiologische Kochsalzlösung + 0,05 ccm Erythrocytensuspension. Eine Haemolyse darf nicht eintreten.
- 2.) Komplementkontrolle (Kpl.): 0,1 ccm physiologische Kochsalzlösung + 0,05 ccm Erythrocytensuspension + 0,05 ccm Kaninchenkomplement. Eine Haemolyse darf nicht eintreten.

Die Ablesung der Reaktionen erfolgte zum ersten Mal nach 3 Std. und zum zweiten Mal nach 6 bis 10 Std.. Aufenthalt bei Zimmertemperatur. Die Reaktionsstärken wurden wie folgt bezeichnet:

- = negative Reaktion. Alle Erythrocyten sind ungeschädigt und sedimentiert. Die überstehende Flüssigkeit ist wasserklar.
- sp = Spur. Die Masse der Erythrocyten ist sedimentiert. Die überstehende Flüssigkeit ist schwach rötlich gefärbt.
- 1 : 75 % der Erythrocyten sind sedimentiert, 25 % sind haemolysiert.
- 2 = 50 % der Erythrocyten sind sedimentiert, 50 % sind haemolysiert.
- 3 - 25 % der Erythrocyten sind sedimentiert, 75 % sind haemolysiert.
- 4 = 100 % der Erythrocyten sind haemolysiert.

Nach dem Ansetzen des Versuches und nach der ersten Ablesung wurden die Röhrchen kräftig geschüttelt.

d) Prüfung der Immunseren an 30 Standard-Erythrocyten

Als Standard dienten 30 Rindererythrocyten, die in ihrer Bluttypenstruktur weitgehend bekannt waren. Zeigte ein Immunserum im Haemolysetest mit einer bestimmten Anzahl dieser 30 Erythrocyten, denen ein Faktor gemeinsam war, deutliche Reaktionen, mit anderen Erythrocyten, die diesen Faktor nicht besaßen dagegen keine Reaktion, so sprach das dafür, daß dieses Serum spezifische, gegen den der ersten Gruppe gemeinsamen Blutgruppenfaktor gerichtete Antikörper enthielt. Der Beweis der Spezifität wurde im Absorptionsversuch erbracht.

e) Absorptionsversuch

Im Absorptionsversuch wird die Spezifität der Antikörper dadurch bewiesen, daß sie aus dem Serum durch Bindung an Erythrocyten entfernt werden können, welche die ihnen entsprechenden Blutgruppenfaktoren besitzen. Die für die Absorption geeigneten Erythrocyten wurden im Haemolysetest ermittelt. Zur Absorption mußten, um ein entsprechendes Antikörper-Antigen-Verhältnis herzustellen, Seren mit hohem Antikörpergehalt verdünnt werden. Zur Ausführung des Tests wurde das dreimal gewaschene Sediment des Absorbenten mit der gleichen Menge des zu absorbierenden Serums ohne Komplementzusatz vermischt und unter mehrfachem Umrühren 1 Std. bei Zimmertemperatur und 1 Std. im Kühl-

schränk gehalten. Danach wurde zentrifugiert und das erythrocytenfreie Serum im Haemolysetest geprüft. Trat dabei keine Reaktion mit dem als Absorbenten verwandten Erythrocyten ein, war die Absorption mit Erfolg durchgeführt worden. Vermochte das absorbierte Serum auch andere Erythrocyten, die den gleichen Blutgruppenfaktor besaßen wie der Absorbent, nicht mehr aufzulösen, so war damit bewiesen, daß das Serum vor der Absorption spezifische Antikörper gegen den betreffenden Blutgruppenfaktor enthielt.

2.) Herstellung von Testseren durch Immunisierung von Kaninchen und Schafen mit antigenhaltigen Lösungen

Aufgabe der folgenden Versuche war es, durch chemischen Aufschluß von Erythrocytensediment und Erythrocytenstroma Lösungen herzustellen, welche die blutgruppenspezifischen Substanzen in möglichst reiner und konzentrierter Form enthielten. Mit diesen Lösungen sollten zur Gewinnung von Testseren Kaninchen und Schafe immunisiert werden.

Zur Aufschließung des Erythrocytensedimentes bzw. Erythrocytenstromas wurden folgende Verfahren angewandt:

a) Phenolbehandlung

- 1.) in Anlehnung an die Methode von Mitscherlich und Liess (32),
- 2.) nach der Methode von Morgan und Partridge (35),
- 3.) nach der Kältemethode von Westphal, Lüderitz und Biester (48),
- 4.) nach der Wärmemethode von Westphal, Lüderitz und Biester (48).

b) Fraktionierte Alkoholextraktion nach Hallauer (17).

c) Fermentbehandlung

- 1.) Aufschließung mit Trypsin,
- 2.) Aufschließung mit Papain,
- 3.) Aufschließung mit Pepsin.

d) Kombinierte Extraktion und Digestion.

Aufschließung mit Petroläther, Pepsin und Aceton.

a) Aufschluß von Erythrocytensediment bzw. Erythrocytenstroma durch die Behandlung mit Phenol

1) Versuche in Anlehnung an die Methode von Mitscherlich und Liess (30)

11) Herstellung antigenhaltiger Lösungen

Um ein möglichst optimales Verfahren zu entwickeln, wurde der Herstellungsgang in mehreren Versuchsreihen variiert.

Versuche unter Verwendung von Erythrocytensediment (s. S. 8)

1. Versuch

Als Ausgangsmaterial diente Sediment des Erythrocyten Nr. 28,5 mit den Blutgruppenfaktoren: B G K E'₃ X₂ F L U₂ und Z. Sediment und Acid. carbol. liquefact. wurde im Verhältnis 1 : 5 gemischt und 30 Minuten im Wasserbad gekocht. Danach wurde physiologische Kochsalzlösung zugegeben (Mischungsverhältnis 1 : 20) und die ausfallende braunschwarze, schmierige Masse abzentrifugiert. Die klare überstehende Flüssigkeit wurde auf 1/10tel eingedampft und 24 Std. gegen fließendes Leitungswasser dialysiert. Das Dialysat wurde auf 0,85 % NaCl eingestellt und im Hemmungstest geprüft (Dialysat Nr. 1).

Ergebnis: Tabelle 1 gibt das Versuchsergebnis wieder. Die mit dem unverdünnten Dialysat vorbehandelten Antiseren weisen die gleiche Reaktionsstärke auf wie die unvorbehandelten Seren (Kontrolle 4). Das Dialysat besitzt keine Hemmwirkung.

Tabelle 1

Dialysat Titer	Antiseren									Kontr.	Kontr.	Kontr.
	B	G	K	E' ₃	X ₂	F	L	U ₂	Z	1	2	3
										NaCl/Ery.	Kpl.	Lsg.
unverd.	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	-	-
Kontr. 4	4	4	4	4	4	4	4	4	4			

Tab. 1: Hemmungstest mit Dialysat Nr. 1. - Das Reaktionsergebnis des Hemmungstests ist in Einheiten der Hemmungseigenschaft, das des Haemolysetests in Stärken des Haemolysegrades angegeben.

2. Versuch

In der Tiefkühltruhe haemolysiertes Sediment des Erythrocyten 28,5 wurde mit Acid. carbolic. liquefact. im Verhältnis 1 : 7 gemischt und über der Flamme bis zur Blasenbildung erhitzt. Die Weiterverarbeitung wurde wie folgt vorgenommen:

- a) Zu einem Teil der o. a. Lösung wurden 3 Teile physiologische Kochsalzlösung gegeben und auf pH 9,0 eingestellt. Nach längerem Stehen bildete sich ein dunkelbrauner Bodensatz und eine milchigtrübe überstehende Flüssigkeit. Das gesamte Gemisch wurde 48 Std. gegen fließendes Leitungswasser dialysiert (Dialysat Nr. 2).
- b) Zu einem Teil der o. a. Lösung wurden 2 Teile physiologische Kochsalzlösung gegeben und auf pH 9,0 eingestellt. Die Mischung wurde 8 Tage im Kühlschrank aufbewahrt und danach die überstehende Flüssigkeit und der Bodensatz getrennt gegen fließendes Leitungswasser dialysiert (Dialysat Nr. 3 und Nr. 4).
- c) Ein Teil der o. a. Lösung wurde ohne pH-Gehalt Einstellung 48 Std. gegen fließendes Leitungswasser dialysiert (Dialysat Nr. 5).

Ergebnis: Im Hemmungstest zeigte keines der vier Dialysate eine Hemmwirkung gegenüber den Faktorensereen.

Versuche unter Verwendung von Erythrocytenstroma (s. S. 8).

3. Versuch

Stroma I des Erythrocyten 28,5 und Acid. carbolic. liquefact. wurden im Verhältnis 1 : 10 gemischt und 30 Min. auf 100° C im Wasserbad erhitzt. Die ungelösten Flocken wurden abzentrifugiert und die überstehende Flüssigkeit auf pH 7,2 eingestellt. Danach erfolgte 48-stündige Dialyse gegen fließendes Leitungswasser. Das Dialysat (Nr. 6) wurde auf 0,85 % NaCl eingestellt und im Hemmungstest geprüft.

Ergebnis: Das Dialysat Nr. 6 zeigte keine Hemmwirkung gegenüber den Faktorensereen.

4. Versuch

Stroma I des Erythrocyten 28,5 und Acid. carbolic. liquefact. wurden im Verhältnis von 1 : 10 gemischt und auf pH 7,2 eingestellt. Über der Flamme wurde bis zur Lösung des Bodensatzes erwärmt. Anschließend wurde die Lösung 4 Tage im Kühlschrank aufbewahrt. Die gesamte Lösung wurde danach 48 Std. gegen fließendes Leitungswasser dialysiert, die Kollodiumhüllen dabei nach den ersten 24 Std. erneuert. Nach dem Abzentrifugieren der ausgefallenen Flocken wurde das Dialysat (Nr. 7) im Hemmungstest geprüft.

Ergebnis: Das Versuchsergebnis ist in Tabelle 2 dargestellt. Die mit dem unverdünnten Dialysat vorbehandelten Testseren zeigten eine vollständige bzw. teilweise Herabsetzung ihres Reaktionsvermögens. In den Verdünnungsstufen 1 : 2, 1 : 4 und 1 : 8 bedingt das Dialysat eine Verminderung der Reaktionsstärke, wie ein Vergleich mit den unvorbehandelten Testseren (Kontrolle 4) beweist.

Tabelle 2

Dialysat Titer	Antiseren							Kontr.	Kontr.	Kontr.
	B	G	E ₃	X ₂	F	L	Z	1 NaCl/Ery.	2 Kpl.	3 Lsg.
unverd.	5	5	5	5	3	5	5	-	-	-
1/2	2	5	2	2	0	2	5			
1/4	0	2	0	1	0	1	2			
1/8	0	1	0	0	0	0	0			
Kontr. 4	4	3 ⁺	4	4	4	4	4			

Tab. 2: Hemmungstest mit Dialysat Nr. 7. -
Zahlenerklärung s. Tabelle 1, S. 14

5. Versuch

Stroma I des Erythrocyten 28,5 und Acid, carbolic, liquefact. wurden im Verhältnis von 1 : 10 gemischt und auf pH 7,2 eingestellt, über der Flamme bis zur Lösung des Bodensatzes erwärmt und anschließend 4 Tage im Kühlschrank aufbewahrt. Dann wurde die Mischung 30 Min. bei 3 000 U./Min. zentrifugiert, dabei entstanden drei Phasen:

- 1.) braun, klar, wäßrig,
- 2.) weiß, sedimentartig,
- 3.) farblos, wäßrig.

Dialysiert wurde 24 Std. gegen fließendes Leitungswasser und zwar Phase 1 gesondert (Dialysat Nr. 8) und Phase 2 und 3 zusammen (Dialysat Nr. 9). Die Dialysate wurden auf pH 7,2 und 0,85 % NaCl eingestellt und im Hemmungstest geprüft.

Ergebnis: Tabelle 3 gibt das Ergebnis des Hemmungstests mit Dialysat Nr. 8 wieder. Die mit dem unverdünnten Dialysat vorbehandelten Testseren zeigten keine Reaktion. Eine Verminderung der Reaktionsstärke war nach der Vorbehandlung mit dem verdünnten Dialysat bis zum Titer 1 : 16 nachweisbar. In Tabelle 4 ist das Ergebnis des Hemmungstests mit

Dialysat Nr. 9 wiedergegeben. Die Aufhebung des Reaktionsvermögens der Testseren erfolgte nach der Vorbehandlung mit dem unverdünnten und dem 1 : 2 verdünnten Dialysat, eine Verminderung der Reaktionsstärke der Testseren wurde nach der Einwirkung des 1 : 32 verdünnten Dialysates festgestellt.

Tabelle 3

Dialysat	Antiseren							Kontr. 1	Kontr. 2	Kontr. 3
Titer	B	G	E ₃ [*]	X ₂	F	U ₂	Z	NaCl/Ery.	Kpl.	Lsg.
unverd.	5	5	5	5	5	5	5	-	-	-
1/2	5	5	5	5	3	5	5			
1/4	3	5	2	2	0	5	5			
1/8	0	3	0	0	0	3	2			
1/16	0	3	0	0	0	2	1			
1/32	0	0	0	0	0	0	0			
Kontr.										
4	4	3 ⁺	4	4	4	4	4			

Tab. 3: Hemmungstest mit Dialysat Nr. 8. -
Zahlenerklärung s. Tabelle 1, Seite 14

Tabelle 4

Dialysat	Antiseren							Kontr. 1	Kontr. 2	Kontr. 3
Titer	B	G	E ₃ [*]	X ₂	F	U ₂	Z	NaCl/Ery.	Kpl.	Lsg.
unverd.	5	5	5	5	5	5	5	-	-	-
1/2	5	5	5	5	5	5	5			
1/4	4	5	5	3	4	5	5			
1/8	1	4	3	2	3	5	5			
1/16	1	1	2	1	0	2	2			
1/32	1	0	1	1	0	1	1			
1/64	0	0	0	0	0	0	0			
Kontr. 4	4	3 ⁺	4	4	4	4	4			

Tab. 4: Hemmungstest mit Dialysat Nr. 9. -
Zahlenerklärung s. Tabelle 1, Seite 14

6. Versuch

Stroma I des Erythrocyten 28,5 und Acid. carbolic. liquefact. wurden im Verhältnis von 1 : 8 gemischt, auf pH 7,4 eingestellt und drei Tage im Kühlschrank aufbewahrt. Danach wurde der Bodensatz abzentrifugiert und die überstehende Flüssigkeit 72 Std. gegen fließendes Leitungswasser dialysiert (Dialysat Nr. 10).

Der abzentrifugierte Bodensatz wurde noch weitere 3 Tage im Kühlschrank aufbewahrt und anschließend 48 Std. gegen fließendes Leitungswasser dialysiert. Die Flüssigkeit wurde aus den Kollodiumhüllen von den ausgefallenen Flocken abgossen und noch einmal 24 Std. gegen fließendes Leitungswasser dialysiert (Dialysat Nr. 11). Die Dialysate Nr. 10 und Nr. 11 wurden auf 0,85 NaCl eingestellt und im Hemmungstest geprüft.

Ergebnis: Tabelle 5 gibt das Ergebnis des Hemmungstests mit dem Dialysat Nr. 10 wieder. Nach Vorbehandlung mit dem unverdünnten Dialysat zeigten nur die Antiseren "G", "U₂" und "Z" eine deutliche Herabsetzung der Reaktionsstärke, die Antiseren "E₃" und "F" wurden nicht beeinflusst. In den Verdünnungsstufen 1 : 2, 1 : 4 und 1 : 8 verursachte das Dialysat nur bei den Antiseren "G", "X₂" und "U" eine geringgradige Verminderung der Reaktionsstärke.

Aus Tabelle 6 ist das Ergebnis des Hemmungstests mit Dialysat Nr. 11 ersichtlich. Die Vorbehandlung mit dem unverdünnten Dialysat führte bei allen Antiseren zur vollständigen Hemmung des Reaktionsvermögens. In der Verdünnung 1 : 2 zeigte das Dialysat eine deutliche, in den Verdünnungen 1 : 4, 1 : 8 und 1 : 16 eine mäßige Hemmwirkung auf die Reaktionsstärke der Testseren.

Tabelle 5

Dialysat Titer	Antiseren								Kontr. 1	Kontr. 2	Kontr. 3
	B	G	E ₃ '	X ₂	F	L	U ₂	Z	NaCl/Ery.	Kpl.	Lsg.
unverd.	1	3	0	1	0	1	5	2	-	-	-
1/2	0	3	0	1	0	1	5	1			
1/4	0	2	0	1	0	0	3	1			
1/8	0	2	0	1	0	0	2	0			
1/16	0	0	0	0	0	0	0	0			
Kontr. 4	4	4	4	4	4	4	4	4			

Tab. 5: Hemmungstest mit Dialysat Nr. 10. -

Zahlenerklärung s. Tabelle 1, Seite 14

Tabelle 6

Dialysat Titer	Antiseren							Kontr. 1	Kontr. 2	Kontr. 3	
	B	G	E ₃	X ₂	F	L	U ₂	Z	NaCl/Ery.	Kpl.	Lsg.
unverd.	5	5	5	5	5	5	5	5	-	-	-
1/2	5	3	4	5	5	4	4	5			
1/4	2	1	1	2	1	1	0	2			
1/8	1	0	0	1	0	0	0	1			
1/16	1	0	0	1	0	0	0	0			
Kontr. 4	4	4	4	4	4	4	4	4			

Tab. 6: Hemmungstest mit Dialysat Nr. 11. -
Zahlenerklärung s. Tabelle 1, Seite 14

7. Versuch

Als Ausgangsmaterial diente Stroma I des Erythrocyten 264 mit den Blutgruppenfaktoren: A B O E₃ C₂ W X und F.

Stroma I und Acid. carbolic. liquefact. wurden im Verhältnis von 1 : 20 gemischt und auf pH 7,4 eingestellt. Ein Teil dieser Lösung wurde sofort dialysiert (Dialysat Nr. 12), der Rest wurde drei Tage im Kühlschrank aufbewahrt und danach dialysiert (Dialysat Nr. 13). Nach einer Dialysedauer von 48 Std. wurden die Dialysate auf 0,85 % NaCl eingestellt und im Hemmungstest geprüft.

Ergebnis: Durch die Vorbehandlung mit dem unverdünnten Dialysat Nr. 12 wurde die Reaktionsstärke der Testseren nicht beeinflusst. Das Dialysat Nr. 12 besaß keine Hemmwirkung.

Das Ergebnis des Hemmungstests mit Dialysat Nr. 13 ist in Tabelle 7 wiedergegeben. Eine Beeinflussung des Reaktionsvermögens durch Dialysat Nr. 13 wurde nur bei dem Testserum anti-F festgestellt. Die Vorbehandlung sowohl mit dem unverdünnten als auch mit dem 1 : 2 und 1 : 4 verdünnten Dialysat führte bei diesem Serum zur vollständigen Reaktionshemmung. In der Dialysatverdünnung 1 : 8 war bei anti-F noch eine deutliche Verminderung der Reaktionsstärke nachweisbar, die anderen Testseren wurden durch das Dialysat Nr. 13 nicht gehemmt.

Tabelle 7

Dialysat Titer	Antiseren							Kontr. 1	Kontr. 2	Kontr. 3
	A ₁	B	O ₁	E' ₃	W	X ₁	F	NaCl/Ery.	Kpl.	Lsg.
unverd.	0	0	0	0	0	0	5	-	-	-
1/2	0	0	0	0	0	0	5			
1/4	0	0	0	0	0	0	5			
1/8	0	0	0	0	0	0	3			
1/16	0	0	0	0	0	0	0			
Kontr. 4	4	4	4	4	4	4	4			

Tab. 7: Hemmungstest mit Dialysat Nr. 13. -
Zahlenerklärung s. Tabelle 1, Seite 14.

Versuche unter Verwendung von Erythrocytenstroma II. (s. S. 8)

8. Versuch

Als Ausgangsmaterial diente Stroma II des Erythrocyten 28,5 mit den Blutgruppenfaktoren: B G K E'₃ X₂ F L U₂ und Z. Stroma II und Acid. carbolic. liquefact. wurden im Verhältnis von 1 : 4 gemischt und 4 Tage im Kühlschrank aufbewahrt. Bei der anschließenden Dialyse gegen fließendes Leitungswasser befand sich nach 24 Std. keine Flüssigkeit mehr in den Kollodiumhüllen. Die zurückgebliebenen Flocken wurden mit physiologischer Kochsalzlösung ausgespült und die Dialyse mit dieser Aufschwemmung noch weitere 24 Std. fortgesetzt. Danach wurde das Dialysat abgegossen, auf pH 7,4 und 0,85 % NaCl eingestellt und im Hemmungstest austitriert (Dialysat Nr. 14).

Ergebnis: Aus Tabelle 8 ist das Ergebnis des Hemmungstests mit Dialysat Nr. 14 ersichtlich. Die Vorbehandlung mit dem Dialysat Nr. 14 führte nur bei dem Testserum anti-F zu einer vollständigen Reaktionshemmung und zwar bis zur Dialysat-Verdünnung 1 : 2. In der Verdünnung 1 : 4 verursachte das Dialysat Nr. 14 bei dem Testserum anti-F noch eine deutliche Verminderung der Reaktionsstärke. Eine geringgradige Beeinträchtigung durch die Dialysat-Vorbehandlung wurde nur noch bei dem Testserum anti-X₂ festgestellt, die anderen Testseren blieben unbeeinflusst.

Tabelle 8

Dialysat Titer	Antiseren							Kontr. 1	Kontr. 2	Kontr. 3
	B	E' ₃	X ₂	F	L	U ₂	Z	NaCl/Ery.	Kpl.	Lsg.
unverd.	0	0	1	5	0	0	0	-	-	-
1/2	0	0	1	5	0	0	0			
1/4	0	0	1	3	0	0	0			
1/8	0	0	0	0	0	0	0			
Kontr. 4	4	4	4	4	4	4	4			

Tab. 8: Hemmungstest mit Dialysat Nr. 14. -
Zahlenerklärung s. Tabelle 1, Seite 14.

9. Versuch

Als Ausgangsmaterial diente Stroma II des Erythrocyten 264 mit den Blutgruppenfaktoren: A B O E'₃ C₂ W X und F.

a) 2 g Stroma II und 100 ccm Acid. carbolic. liquefact. (90 %ig) wurden bis zum Kochen erhitzt und danach auf pH 7,4 eingestellt. Die Mischung wurde 4 Tage bei Zimmertemperatur gehalten und dabei täglich einmal über der Flamme zum Kochen gebracht. Abschließend wurden die ungelösten Flocken abzentrifugiert und die klare, braune überstehende Flüssigkeit 72 Std. gegen fließendes Leitungswasser dialysiert (Dialysat Nr. 15). Nach der Einstellung auf 0,85 % NaCl wurde das Dialysat im Hemmungstest geprüft. Da nicht genügend Material zur Verfügung stand, konnte das unverdünnte Dialysat nicht getestet werden.

Ergebnis: In Tabelle 9 ist das Versuchsergebnis dargestellt. Durch die Vorbehandlung mit dem 1 : 2 verdünnten Dialysat Nr. 15 kam es bei den Testseren anti-O₁, anti-X₁ und anti-X₂ zu einer vollständigen Reaktionshemmung, bei den Antiseren B und E'₃ zeigte sich eine deutliche Herabsetzung der Reaktionsstärke. Das Dialysat Nr. 15 zeigte auch noch in der Verdünnung 1 : 8 eine Hemmwirkung gegenüber den genannten Seren.

Tabelle 9

Dialysat Titer	Antiseren									Kontr. 1	Kontr. 2	Kontr. 3
	A ₁	B	O ₁	O ₃	E' ₃	W	X ₁	X ₂	F	NaCl/Ery.	Kpl.	Lsg.
1/2	0	2	5	0	2	1	5	5	0	-	-	-
1/4	0	2	3	0	1	1	4	5	0			
1/8	0	1	3	0	0	0	4	5	0			
Kontr. 4	4	4	4	4	4	4	3	4	4			

Tab. 9: Hemmungstest mit Dialysat Nr. 15. -
Zahlenerklärung s. Tabelle 1, Seite 14.

b) 2 g Stroma II und 60 ccm Acid. carbohc. liquefact. (75 %ig) wurden bis zum Kochen erhitzt und nach der unter a) angegebenen Methode weiterbehandelt. Das Dialysat Nr. 16 wurde im Hemmungstest geprüft.

Ergebnis: Die Vorbehandlung mit Dialysat Nr. 16 hatte keinen Einfluß auf die Reaktionsstärke der Testseren. Das Dialysat besaß keine Hemmwirkung.

c) 2 g Stroma II und 60 ccm Acid. carbohc. liquefact. (50 %ig) wurden bis zum Kochen erhitzt und nach der unter a) angegebenen Methode weiterbehandelt. Das Dialysat Nr. 17 wurde im Hemmungstest geprüft.

Ergebnis: In Tabelle 10 ist das Ergebnis des Versuches dargestellt. Eine vollständige Reaktionshemmung trat nach der Vorbehandlung mit dem unverdünnten Dialysat Nr. 17 bei den Antiseren O₁, E'₃, X₁ und X₂ auf. Die Antiseren X₁ und X₂ zeigten auch nach der Behandlung mit dem 1 : 2 und 1 : 4 verdünnten Dialysat Nr. 17 keine Reaktion. Bei den Seren anti-B und anti-W kam es durch die Dialysateinwirkung lediglich zu einer Verminderung der Reaktionsstärke, während die Antiseren A, O₃ und F keine Beeinflussung erfuhren.

Tabelle 10

Dialysat		Antiseren								Kontr. 1	Kontr. 2	Kontr. 3
Titer	A ₁	B	O ₁	O ₃	E' ₃	W	X ₁	X ₂	F	NaCl/Ery.	Kpl.	Lsg.
unverd.	0	4	5	0	5	1	5	5	0			
1/2	0	3	5	0	5	0	5	5	0			
1/4	0	1	2	0	1	0	5	5	0			
Kontr. 4	4	4	3 ⁺	4	4	4	4	4	4			

Tab. 10: Hemmungstest mit Dialysat Nr. 17. -
Zahlenerklärung s. Tabelle 1, Seite 14.

d) 2 g Stroma II und 60 ccm Acid. carbol. liquefact. (25 %ig) wurden bis zum Kochen erhitzt und nach der unter a) angegebenen Methode weiterbehandelt. Das Dialysat Nr. 18 wurde im Hemmungstest geprüft.

Ergebnis: Die Vorbehandlung mit Dialysat Nr. 18 hatte keinen Einfluß auf die Reaktionsstärke der Testseren. Das Dialysat besaß keine Hemmwirkung.

10. Versuch

Als Ausgangsmaterial diente Stroma II des Erythrocyten 28,5 mit den Blutgruppeneinfaktoren: B G K E₃ X₂ F L U₂ und Z. -

3 g Stroma II wurden mit 200 ccm Acid. carbol. liquefact. (50 %ig) bis zum Kochen erhitzt und danach 11 Tage bei Zimmertemperatur aufbewahrt. Anschließend wurde die Mischung scharf zentrifugiert, dabei entstanden drei Phasen:

- 1.) braun, klar, wäßrig,
- 2.) weiß, sedimentartig,
- 3.) milchigtrüb, wäßrig.

Die drei Phasen wurden getrennt, Phase 1 und 2 im Wasserbad um 50 % eingengt und anschließend dialysiert. Die mit Phase 1 beschickten Kollodiumhüllen enthielten nach 24 Std. keine Flüssigkeit, sondern nur noch graubraune Membranen und Flocken. Die Hüllen wurden aufgeschnitten, ausgeschabt und mit 10 ccm physiologischer Kochsalzlösung abgespült. Die in der Kochsalzlösung aufgefangenen Flocken wurden dann noch einmal 48 Std. gegen fließendes Leitungswasser dialysiert (Dialysat Nr. 19). Die Dialysate Nr. 19, Nr. 20 (Phase 2) und Nr. 21 (Phase 3) wurden nach Einstellung auf 0,85 % NaCl im Hemmungstest geprüft.

Ergebnis: Nach der Vorbehandlung mit dem unverdünnten Dialysat Nr. 19 trat nur bei dem Testserum anti-F eine Verminderung der Reaktionsstärke ein, die anderen Testseren blieben unbeeinflusst (Tab. 11). Nach der Vorbehandlung mit dem unverdünnten Dialysat Nr. 20 kam es bei den Antiseren F und L zu einer vollständigen Reaktionshemmung, in der Verdünnung 1 : 2 zeigte sich eine ebenso starke Hemmwirkung des Dialysates nur noch gegenüber dem Testserum anti-F. Die übrigen Testseren wurden in ihrer Reaktionsstärke durch das Dialysat Nr. 20 nicht beeinflusst (Tab. 12).

Nach der Vorbehandlung mit Dialysat Nr. 21 kam es bei den Antiseren B, K, X₂, L und Z lediglich zu einer Verminderung der Reaktionsstärke, eine vollständige Reaktionshemmung trat bei keinem Serum ein, die Testseren anti-E₃ und anti-F wurden nicht beeinflusst (Tab. 13).

Tabelle 11

Dialysat Titer	Antiseren							Kontr. 1	Kontr. 2	Kontr. 3
	B	K	E' ₃	X ₂	F	L	Z	NaCl/Ery.	Kpl.	Lsg.
unverd.	0	0	0	0	4	0	0	-	-	-
1/2	0	0	0	0	3	0	0			
1/4	0	0	0	0	2	0	0			
1/8	0	0	0	0	0	0	0			
Kontr. 4	4	4	4	4	4	4	4			

Tab. 11: Hemmungstest mit Dialysat Nr. 19. -
Zahlenerklärung s. Tabelle 1, Seite 14.

Tabelle 12

Dialysat Titer	Antiseren							Kontr. 1	Kontr. 2	Kontr. 3
	B	K	E' ₃	X ₂	F	L	Z	NaCl/Ery.	Kpl.	Lsg.
unverd.	0	0	0	0	5	5	0	-	-	-
1/2	0	0	0	0	5	1	0			
1/4	0	0	0	0	1	1	0			
1/8	0	0	0	0	1	0	0			
1/16	0	0	0	0	0	0	0			
Kontr. 4	4	4	4	4	4	4	4			

Tab. 12: Hemmungstest mit Dialysat Nr. 20. -
Zahlenerklärung s. Tabelle 1, Seite 14.

Tabelle 13

Dialysat Titer	Antiseren							Kontr. 1	Kontr. 2	Kontr. 3
	B	K	E' ₃	X ₂	F	L	Z	NaCl/Ery.	Kpl.	Lsg.
unverd.	1	1	0	1	0	4	2	-	-	-
1/2	0	0	0	1	0	3	0			
1/4	0	0	0	0	0	0	0			
Kontr. 4	4	4	4	4	4	4	4			

Tab. 13: Hemmungstest mit Dialysat Nr. 21. -
Zahlenerklärung s. Tabelle 1, Seite 14.

TABELLE 14

Ver- such Nr.	Acid.carbolic. liquefactum %	Mischgs.- Verhältnis	Er hit zung		pH- Gehalt- Einstellg. auf:	We i t e r v e		
			einmal Zeit	mehrfach Temp. Zeit Temp.		Gesamtlösung Aufbewahrg.	übersu. sofort	
VERARBEITUNG VON ERYTHROC								
1	90	1 : 5	30"	100°	9,0		+	
2a	90	1 : 7	1"	100°	9,0	+		
2b	90	1 : 7	1"	100°	9,0	8 Tg. +5°C	+	
2c	90	1 : 7	1"	100°		+		
VERARBEITUNG VON ERYTHROC								
3	90	1 : 10	30"	100°	7,2		+	
4	90	1 : 10	1"	100°	7,2	4 Tg. +5°C		
5	90	1 : 10	1"	100°	7,2	4 Tg. +5°C	Phase I	
							" II	
							" III	
6	90	1 : 8			7,4	3 Tg. +5°C	+	
7a	90	1 : 20			7,4	+		
7b	90	1 : 20			7,4	3 Tg. +5°C		
VERARBEITUNG VON ERYTHROC								
8	90	1 : 4				4 Tg. +5°C		
9a	90	1 : 50		1" 100°	7,4	4 Tg. +24°C	+	
9b	75	1 : 30		1" 100°	7,4	4 Tg. +24°C	+	
9c	50	1 : 30		1" 100°	7,4	4 Tg. +24°C	+	
9d	25	1 : 30		1" 100°	7,4	4 Tg. +24°C	+	
10	50	1 : 66		1" 100°		11 Tg. +24°C	Phase I	
							" II	
							" III	

Tab. 14: Übersicht der verschiedenen Verarbeitungsgänge für die Isolierung blutgruppenspezifischer Substanzen aus Erythrocytensediment und Erythrocytenstroma mit Hilfe der Phenol-Methode. (s. S. 16 - 26, Versuch 1 - 10).

A r b e i t u n g		Dialyse-	Hemmungstest		Dialysat
Flüssigkeit	Bodensatz	Dauer	pos./neg.	spezifisch	Nr.
Aufbewahrung	Aufbewahrung			gegenüber dem	
Zeit Temp.	sofort	Zeit Temp.		Antiserum:	

T E N S E D I M E N T

		24'	negativ		1
		48'	negativ		2
		48'	negativ		3
	+	48'	negativ		4
		48'	negativ		5

T E N S T R O M A I

		48'	negativ		6
		48'	positiv	B G E' ₃ X ₂ F L Z	7
		24'	positiv	B G E' ₃ X ₂ F U ₂ Z	8
		24'	positiv	B G E' ₃ X ₂ F U ₂ Z	9
		72'	positiv	G U ₂ Z	10
	3 Tg. +5°C	72'	positiv	B E' ₃ X ₂ F L Z	11
		48'	negativ		12
		48'	positiv	F	13

T E N S T R O M A II

		48'	positiv	F	14
		72'	positiv	B O ₁ E' ₃ X ₁ X ₂	15
		72'	negativ		16
		72'	positiv	B O ₁ E' ₃ X ₁ X ₂	17
		72'	negativ		18
		72'	positiv	F	19
		72'	positiv	F L	20
		72'	positiv	G L Z	21

In der Tabelle 14 wurden die Versuche 1 - 10 zusammengestellt, um einen Überblick über die verschiedenen Versuchsanordnungen zu geben. Wie aus der Tabelle ersichtlich, konnten in den mit Erythrocytensediment angesetzten Versuchen (1 und 2) keine im Hemmungstest nachweisbaren blutgruppenspezifischen Substanzen isoliert werden. Bei der Verarbeitung von Erythrocytenstroma I (Versuch 3 bis 7) und Erythrocytenstroma II (Versuch 8 bis 10) gelang die Isolierung blutgruppenspezifischer Substanzen nur bei einer mehrtägigen Einwirkungs-dauer des Phenols. Die sofortige Verarbeitung der Stroma-Phenol-Mischung führte in keinem Fall zu einem positiven Versuchsergebnis (Versuch 3 und 7a). Ohne Einfluß war in den vorliegenden Versuchen

- 1.) Das Mischungsverhältnis von Stroma und Phenol im Bereich von 1 : 8 bis 1 : 50,
- 2.) die einmalige oder wiederholte Erhitzung des Gemisches,
- 3.) die Einstellung des pH-Gehaltes auf 7, 2 bis 7, 4,
- 4.) die Aufbewahrungstemperatur,

12) Herstellung spezifischer Antiseren durch Immunisierung von Kaninchen mit antigenhaltigen Lösungen

Versuchstiere: Für die Immunisierungen wurden Kaninchen von ca. 2 kg Gewicht genommen, in deren Serum bei einer vorausgegangenen Prüfung keine Heteroantikörper gegen Rindererythrocyten nachgewiesen werden konnten.

1. Immunisierungsversuch

In dem 1. Immunisierungsversuch sollte die antigene Wirksamkeit folgender Lösungen bzw. Suspensionen miteinander verglichen werden.

- 1.) Dialysat aus Stroma I des Erythrocyten 28,5,
- 2.) dasselbe Dialysat mit Zusatz von beschalltem Mycobacterium smegmatis- und Aluminiumhydroxyd-Suspension,
- 3.) 5 %ige Suspension des unbehandelten Erythrocyten 28,5,
- 4.) 5 %ige Suspension von Stroma I des Erythrocyten 28,5.

Als Dialysat wurden die miteinander vereinten Dialysate 7, 8 und 9 verwandt. Diese Dialysat-Mischung wurde im Hemmungstest noch einmal ausgewertet. Das Ergebnis ist in Tabelle 15 wiedergegeben.

Tabelle 15

Dialysat Titer	Antiseren								Kontr. 1	Kontr. 2	Kontr. 3
	B	G	E ₃	X ₂	F	L	U ₂	Z	NaCl/Ery.	Kpl.	Lsg.
unverd.	5	5	5	5	5	5	5	5	-	-	-
1/2	4	4	4	4	3	4	5	5			
1/4	3	3	3	3	0	1	3	4			
1/8	1	0	1	1	0	0	1	1			
1/16	0	0	0	0	0	0	0	0			
Kontr. 4	4	4	4	4	4	4	4	4			

Tab. 15: Hemmungstest mit den vereinten Dialysaten Nr. 7, Nr. 8 und Nr. 9. -
Zahlenerklärung s. Tabelle 1, Seite 14.

Ergebnis: Nach der Vorbehandlung mit der unverdünnten Mischung der Dialysate Nr. 7, Nr. 8 und Nr. 9 trat bei allen in der Gebrauchsverdünnung eingesetzten Testseren eine vollständige Reaktionshemmung ein. In den aufsteigenden Verdünnungsstufen des Dialysates zeigten nur noch die Seren anti-U₂ und anti-Z eine starke Verminderung, während es bei den anderen Testseren lediglich zu einer schwachen Beeinflussung der Reaktionsstärke kam.

Versuchsanordnung:

Vier Versuchsgruppen zu je 2 Kaninchen wurden zur Prüfung der verschiedenen Lösungen und Suspensionen angesetzt.

Kaninchen 1 und 2 der ersten Versuchsgruppe wurden mit dem reinen Dialysat immunisiert, dem im Verhältnis 1 : 2 : 1 physiologische Kochsalzlösung und eine 1,6 %ige Formalinlösung zugesetzt worden war.

Kaninchen 3 und 4 der zweiten Versuchsgruppe erhielten dasselbe Dialysat, dem im Verhältnis 1 : 1 : 1 : 1 eine Suspension beschallter Mycobakterien, eine Suspension von Aluminiumhydroxyd und eine 1,6 %ige Formalinlösung hinzugefügt worden war. Die Mycobacteriensuspension war mit physiologischer Kochsalzlösung hergestellt und zur Zertrümmerung der Bakterien 1 1/2 Std. mit Ultraschall behandelt worden. Die Trübung der Bakterien- und Aluminiumhydroxydsuspension wurde so eingestellt, daß die Dichte einer Bariumsulfataufschwemmung von 3 ccm 1 %iger Bariumchloridlösung auf 97 ccm 1 %iger Schwefelsäure entsprach.

Kaninchen 5 und 6 der dritten Versuchsgruppe wurden mit der 5 %igen Suspension des unvorbehandelten Erythrocyten in Rous-Turner-Lösung immunisiert.

Kaninchen 7 und 8 der vierten Versuchsgruppe erhielten eine 5 %ige Suspension von Stroma I desselben Erythrocyten in Rous-Turner-Lösung.

Versuchsanordnung: Die Immunisierung wurde in viertägigen Abständen durchgeführt. Jedes Kaninchen erhielt 2 Injektionen zu 0,5 ccm und 6 Injektionen zu 1,0 ccm intravenös verabreicht. Vier Tage nach der letzten Immunisierung wurden die Seren auf spezifische Antikörper untersucht. Hatte sich im Haemolysetest mit 30 bekannten Rindererythrocyten herausgestellt, daß ein Serum komplementbindende Antikörper gegenüber Blutgruppenfaktoren besaß, dann wurde die Spezifität dieser Antikörper im nachfolgenden Absorptionsversuch bestimmt. Da das Immunisierungsmaterial nach den im Hemmungstest ermittelten Ergebnissen antigene Substanzen mehrerer Blutgruppenfaktoren enthielt, konnte mit der Ausbildung verschiedener blutgruppenspezifischer Antikörper gerechnet werden.

Der Versuch führte zu dem in Tabelle 16 niedergelegten Ergebnis (s. Seite 28).

Aus Tabelle 16 ergibt sich folgendes:

Die Immunisierung mit reinem Dialysat (Versuchsgruppe 1) führte nur bei einem Kaninchen (Nr. 1) zur Ausbildung spezifischer komplementbindender Antikörper, die noch in einer Serumverdünnung von 1 : 8 wirksam waren. Im Haemolysetest und Absorptionsversuch ließ sich nachweisen, daß diese Antikörper nur gegen den Blutgruppenfaktor X_2 gerichtet waren.

Die Zufügung von beschalltem Mycobacterium und Aluminiumhydroxyd zu dem Dialysat (Versuchsgruppe 2) erbrachte keine nachweisbare Steigerung der antigenen Wirksamkeit des Dialysates. Beide Kaninchen (Nr. 3 und Nr. 4) wiesen in ihrem Serum keine spezifischen komplementbindenden Antikörper auf.

Die zur Kontrolle mit einer 5 %igen Suspension des Erythrocyten 28,5 behandelten Kaninchen Nr. 5 und Nr. 6 der dritten Versuchsgruppe und die mit einer 5 %igen Stromasuspension des Erythrocyten 28,5 immunisierten Kaninchen Nr. 7 und Nr. 8 der vierten Versuchsgruppe hatten spezifische komplementbindende Antikörper gebildet, die gegenüber einigen Erythrocyten noch in einer Serumverdünnung von 1 : 1024 wirksam waren. Die Spezifitätsprüfung im Haemolysetest und Absorptionsversuch ergab, daß die Antikörper gegen den Blutgruppenfaktor F gerichtet waren. Unterschiedliche Absorptionseffekte zeigten sich bei der Verwendung von Absorbenten mit der Bluttypenstruktur F/F bzw. F/V. Nach der Absorption mit homozygoten F-Erythrocyten waren - mit Ausnahme von einigen sehr hochtitrigen Seren - keine Antikörper

Tabelle 16

Versuchs- gruppe	Immunisierungs- material	Versuchs- tier Nr.	Prüfung der Seren auf Immunitätskörper 4 Tage nach der letzten Injektion	Titer
I	reines Dialysat	1	keine haemolisierenden Antikörper	-
		2	spezifische Antikörper gegen den Faktor X ₂	1 : 8
II	Dialysat + Mycobact. smg. + Aluminiumhydroxyd	3	keine haemolisierenden Antikörper	-
		4	keine haemolisierenden Antikörper	-
III	Erythrocyten- Suspension von 28,5	5	spezifische Antikörper gegen den Faktor V nach Absorption mit V/V-Erythrocyten	1 : 2048
		6	"	1 : 4096
IV	Stroma- Suspension von 28,5	7	"	1 : 2048
		8	"	1 : 1024

Tab. 16: Ergebnis des 1. Immunisierungsversuches

mehr nachweisbar, während nach der Absorption mit F/V-Erythrocyten in allen Seren noch Antikörper verblieben, die mit F/F-Erythrocyten reagierten.

2. Immunisierungsversuch

In dem zweiten Immunisierungsversuch sollte die antigene Wirksamkeit von sechs Lösungen bzw. Suspensionen miteinander verglichen werden, die alle 1 Vol. Teil Dialysat und 1 Vol. Teil einer 1,6 %igen Formalinlösung enthielten. Zu dieser Ausgangslösung wurden die im folgenden aufgeführten Zusätze gegeben und in jeweils einer Versuchsgruppe geprüft:

- Gruppe I: 2 Vol. Teile physiologische Kochsalzlösung,
- Gruppe II: 2 Vol. Teile Aluminiumhydroxyd,
- Gruppe III: 2 Vol. Teile beschalltes Mycobacterium smegmatis,
- Gruppe IV: 1 Vol. Teil Aluminiumhydroxyd und
1 Vol. Teil beschalltes Mycobacterium smegmatis,
- Gruppe V: 2 Vol. Teile Pferdeserumglobulin,
- Gruppe VI: 1 Vol. Teil Pferdeserumglobulin und
1 Vol. Teil Aluminiumhydroxyd.

Als antigenhaltige Lösung diente das aus Versuch 8 stammende Dialysat Nr. 14 (s. S. 20). - Von den mit diesem Dialysat vorbehandelten Seren zeigte nur das Testserum anti-F eine vollständige Hemmung seines Reaktionsvermögens.

Die Aluminiumhydroxyd- und Bakteriensuspension wurden in der im 1. Immunisierungsversuch beschriebenen Dichte verwandt (s. S.). Das Pferdeserumglobulin war nach der von R. Dujarric de la Rivière (52) gegebenen Vorschrift hergestellt worden.

Zu jeder Versuchsgruppe gehörten zwei Kaninchen, jedes Tier erhielt 2mal 0,5 ccm und 6mal 1,0 ccm des Immunisierungsmaterials in viertägigen Abständen intravenös injiziert. Sechs Tage nach der letzten Injektion wurden die Seren auf spezifische Antikörper untersucht. Der Versuch führte zu dem in Tabelle 17 zusammengestellten Ergebnis. (s. Seite 30).

Aus Tabelle 17 ergibt sich, daß die antigene Wirkung des reinen Dialysates (Versuchsgruppe I) durch die Zugabe von Aluminiumhydroxyd (Versuchsgruppe II), beschallten Mycobakterien (Versuchsgruppe III), beschallten Mycobakterien und Aluminiumhydroxyd (Versuchsgruppe IV), Pferdeserumglobulin (Versuchsgruppe V) oder Pferdeserumglobulin und Aluminiumhydroxyd (Versuchsgruppe VI) in nachweisbarem Umfange nicht gesteigert werden konnte.

Tabelle 17

Versuchs- gruppe	Immunisierungs- material	Versuchs- tier Nr.	Prüfung der Seren auf Immunitätskörper 6 Tage nach der letzten Injektion	Titer
I	reines Dialysat	9 10	spezifische Antikörper gegen den Faktor F "	1 : 64 1 : 8
II	Dialysat + Aluminiumhydroxyd	11 12	" "	1 : 128 1 : 64
III	Dialysat + Mycobacterium smegmatis	13 14	" "	1 : 128 1 : 64
IV	Dialysat + Aluminiumhydroxyd + Mycobact. smegmatis	15 16	" "	1 : 16 1 : 16
V	Dialysat + Pferdeserum- globulin	17 18	" "	1 : 16 1 : 512
VI	Dialysat + Pferdeserumglobulin + Aluminiumhydroxyd	19 20	" "	1 : 256 1 : 16

Tab. 17: Ergebnis des 2. Immunisierungsversuches

Die Differenzen der erreichten Titerhöhen sind innerhalb der Gruppen etwa genau so groß wie zwischen den einzelnen Gruppen.

Im Absorptionsversuch ließen sich in allen Seren nur Antikörper gegen den Blutgruppenfaktor F nachweisen. Auffällig war jedoch wiederum, daß nach Absättigung der Antiseren mit Rindererythrocyten der Bluttypenstruktur F/V Antikörper in den Seren verblieben, die nur mit F/F-Erythrocyten reagierten, während bei der Verwendung von F/F-Erythrocyten als Absorbenten sämtliche Antikörper aus den Seren entfernt wurden.

13) Diskussion

Durch die Behandlung von Erythrocytenstroma mit Phenol und nachfolgender Dialyse konnten Lösungen hergestellt werden, die den serologisch im Hemmungstest nachweisbaren Anteil der Blutgruppenfaktoren B G E₃ O X F L U₂ und Z enthielten. Die Isolierung gelang jedoch nur bei einer mehr-tägigen Einwirkungsdauer des Phenols im sauren bis neutralen Bereich, wobei der mengenmäßige Anteil der spezifischen Substanzen für die einzelnen Faktoren in den Dialysaten erhebliche Unterschiede zeigte. Das im 1. Immunisierungsversuch verwandte Dialysat-Gemisch (s. Tabelle 15, S. 26) enthielt bedeutend mehr spezifische Substanzen der Blutgruppenfaktoren B E₃ und X₂ als des Faktors F, mit seiner Hilfe konnte von einem Kaninchen (Nr. 2, Tabelle 16) ein reines anti-X₂ Testserum gewonnen werden. Das im 2. Immunisierungsversuch verwandte Dialysat Nr. 14 enthielt in nachweisbaren Mengen nur die spezifische Substanz des Blutgruppenfaktors F. Mit diesem Material konnten nur anti-F-Testseren gewonnen werden (Kaninchen Nr. 9 bis Nr. 20, Tab. 17). Durch den Zusatz von Aluminiumhydroxyd, Suspension beschallter Mycobacterien, Pferdeserumglobulin oder Kombination dieser Substanzen zu den antigenhaltigen Lösungen konnte deren immunogene Wirksamkeit nicht gesteigert werden.

Die von den Kaninchen nach der Immunisierung mit Erythrocytenstroma bzw. Suspensionen unvorbehandelter Erythrocyten gewonnenen Antiseren wiesen stets einen weit höheren Antikörpertiter auf als die Seren, welche nach Vorbehandlung mit antigenhaltigen Dialysaten von den Kaninchen gebildet wurden.

Die nach der Immunisierung mit antigenhaltigen Lösungen, Erythrocytenstroma- oder Erythrocytensuspensionen von Kaninchen gewonnenen anti-F-Seren zeigten nach der Absorption mit F/V-Erythrocyten noch Reaktionen mit F/F-Erythrocyten, während die Verwendung von homozygoten F-Erythrocyten als Absorbenten sämtliche Antikörper entfernte.

2) Versuch nach der Methode von Morgan und Partridge (35)

Als Ausgangsmaterial diente Stroma I des Erythrocyten 28,5, der die Blutgruppenfaktoren B G K E₃ X₂ F L U₂ und Z besaß. 10 ccm Stroma I und 60 ccm Acid. carbolic. liquefact. wurden gemischt und 96 Std. bei Zimmertemperatur aufbewahrt. Danach wurde zentrifugiert und von der überstehenden Flüssigkeit 1 Vol. Teil mit 3 Vol. Teilen 96 %igen Alkohol zusammengebracht. Die erwartete Präzipitation trat nicht ein. Die nicht mit Alkohol behandelte überstehende Flüssigkeit wurde in Kollodiumhüllen gegeben und 72 Std. gegen fließendes Leitungswasser dialysiert. Der mit dem Dialysat angesetzte Hemmungstest hatte ein negatives Ergebnis.

3) Versuch nach der Kältemethode von Westphal, Lüderitz und Biester (48)

Als Ausgangsmaterial diente Stroma II des Erythrocyten 28,5 (s. Seite 8).

5 g Stroma II wurden in 80 ccm Aqu. dest. gegeben und auf 2° C vorgekühlt, anschließend wurden 130 ccm einer auf 5° C vorgekühlten 75 %igen Phenollösung hinzugefügt und die Mischung bei wiederholtem Aufschütteln 30 Min. im Kühlschrank belassen. Danach wurde bei 3 000 U./Min. in der Kälte zentrifugiert. Hierbei entstanden vier Schichten:

- 1.) wäßrig, weißlich-getrübt,
- 2.) weiß, homogen,
- 3.) ungelöste Flocken und
- 4.) klar-braune Phenol-Schicht.

Die oberste Schicht (1) wurde abgehoben, das restliche Zentrifugat mit 25 ccm Aqu. dest. durchgeschüttelt und noch einmal zentrifugiert. Es entstanden wieder die genannten vier Schichten. 1) wurde abgehoben und mit der wäßrigen Lösung des ersten Zentrifugates vereinigt. Die Schichten 1), 2) und 4) wurden gesondert in Kollodiumhüllen 3 Tage gegen fließendes Leitungswasser dialysiert und anschließend im Hemmungstest geprüft. Keines der Dialysate zeigte deutliche Hemmwerte.

4) Versuch nach der Wärmemethode von Westphal, Lüderitz und Biester (48)

Als Ausgangsmaterial diente Stroma II (s. S. 8) des Erythrocyten 28,5.

5 g Stroma II wurden in 175 ccm Aqu. dest. im Wasserbad auf 68° C erwärmt und unter Rühren mit 175 ccm auf 68° vorgewärmten 90 %igen Phenol versetzt.

Die Mischung wurde 30 Min. unter mehrfachem Umrühren im Wasserbad bei 68° C belassen. Danach wurde bei 5° C und 3 000 U./Min. zentrifugiert. Es entstanden drei Schichten:

- 1.) wäßrig, weißlich-getrübt,
- 2.) homogene weiße Schicht und
- 3.) ungelöste Flocken.

Die oberste Schicht (1) wurde abgehoben und das restliche Zentrifugat mit 25 ccm Aqu. dest. durchgeschüttelt und erneut zentrifugiert. Es entstanden wieder die genannten drei Schichten, die wäßrige Lösung wurde abgehoben und mit Schicht 1 des ersten Zentrifugates vereinigt. Die 1. und 2. Schicht wurden getrennt 3 Tage gegen fließendes Leitungswasser dialysiert und anschließend im Hemmungstest ausstitriert. Keines der Dialysate zeigte deutliche Hemmwerte.

b) Aufschluß von Erythrocytenstroma durch fraktionierte Alkoholextraktion nach Hallauer (17)

Als Ausgangsmaterial diente Stroma II (s. S. 8) des Erythrocyten 28,5.

1, 2 g Stroma II wurden mit der 5fachen Menge absoluten Alkohols 4 Tage lang bei Zimmertemperatur extrahiert, danach der Alkohol abfiltriert und verworfen. Der Rückstand wurde jeweils 4 Tage mit 75 %igem, 50 %igem und 10 %igem Alkohol extrahiert. Die aus den einzelnen Extraktionen stammenden Filtrate wurden zusammengegossen und der Alkohol bei 40° C und Unterdruck (Wasserstrahlpumpe) abdestilliert. Der verbleibende wäßrige Extrakt wurde auf 0,85 % NaCl eingestellt und mit der 5fachen Menge Aceton vermischt. Eine Präzipitation blutgruppenspezifischer Substanzen, die Hallauer (15) bei der Verarbeitung menschlicher Erythrocyten erzielte, trat nicht ein.

c) Aufschluß von Erythrocytenstroma durch Fermentbehandlung

1) Aufschließung mit Trypsin

11) Herstellung antigenhaltiger Lösungen

Bisher wurden Erythrocyten von Tieren (28,5 und 264) verwandt, die im FV-System homozygot F/F veranlagt waren. Im Gegensatz dazu wurden in den folgenden Versuchen Erythrocyten von Individuen mit dem Genotyp F/V oder V/V verarbeitet.

1. Versuch

Zur Gewinnung antigenhaltiger Lösungen wurde Stroma II mit Trypsin in folgender Weise aufgeschlossen:

4 g Stroma II, 100 ccm Aqu. dest. und 1 g Trypsin (1 : 250 der Fa. Fisco) wurden zusammen, nach der Einstellung des pH-Gehaltes auf 8,5, zwei Stunden im Wasserbad bei 40° C gehalten. Anschließend wurde die Mischung zentrifugiert und die überstehende, hellbraune, leicht opaleszierende Flüssigkeit vom Bodensatz abgossen. Sie wurde auf Eiweißstoffe mit dem Millon- und Xanthoproteinreaktion und auf blutgruppenspezifische Substanzen im Hemmungstest untersucht.

Um die Wirksamkeit dieses Verfahrens im Vergleich mit der Phenolmethode beurteilen zu können, wurde 1 g desselben Stromas II mit 25 ccm Acid. carbolic. liquefact. bis zum Kochen erhitzt und anschließend 6 Tage im Kühlschrank aufbewahrt. Die Lösung wurde 24 Stunden dialysiert. Nach dieser Zeit befanden sich in den Kollodiumhüllen nur noch Flocken, sie wurden in physiologische Kochsalzlösung aufgenommen und mehrfach kräftig geschüttelt. Danach wurde die Suspension zentrifugiert und die überstehende Flüssigkeit abermals 24 Std. dialysiert. Anschließend erfolgte die Prüfung auf Eiweißstoffe mit der Millon- und Xanthoproteinreaktion und die Untersuchung auf blutgruppenspezifische Substanzen im Hemmungstest.

Nach beiden Verfahren wurden antigenhaltige Lösungen aus den Erythrocyten 115 und 132 hergestellt.

Der Erythrocyt 115 besaß die Blutgruppenfaktoren: A B O₃ Y₂ A' E'₃ C X₂ F V J und Z.

In der durch Trypsinbehandlung gewonnenen Lösung (Nr. 22) wurde mit der Xanthoproteinreaktion ein starker (++++) und mit der Millon-Reaktion ein (+) Gehalt an Eiweißsubstanzen nachgewiesen. Der Hemmungstest führte zu dem in Tabelle 18 niedergelegten Ergebnis.

In der durch Vorbehandlung mit Phenol gewonnenen Lösung (Nr. 23) wurde sowohl mit der Xanthoprotein- als auch mit der Millon-Reaktion ein starker Gehalt (++++) an Eiweißsubstanzen nachgewiesen. Die Untersuchung im Hemmungstest führte zu dem in Tabelle 19 niedergelegten Ergebnis.

Tabelle 18

Lösung Titer	Antiseren														Kontr. 1	Kontr. 2	Kontr. 3
	A ₁	A ₂	B	O ₃	Y ₂	A*	E ₃	C ₂	X ₂	F	V	J ₁	J ₂	Z	NaCl/ Ery.	Kpl.	Lsg.
unverd.	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	-	-	-
1/2	3	2	5	5	5	5	5	5	1	5	5	5	5	5			
1/4	3	0	5	5	5	2	3	3	0	5	5	5	2	3			
1/8	1	0	2	2	2	1	0	1	0	5	5	5	1	1			
1/16	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5	5	5	0	0			
1/32	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	5	2	0	0			
1/64	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	3	1	0	0			
1/128	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0			
Kontr.																	
4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4			

Tab. 18: Hemmungstest mit der durch Trypsinbehandlung gewonnenen Lösung Nr. 22 aus Stroma II des Erythrocyten 115. -
Zahlenerklärung s. Tabelle 1, S. 14.

Tabelle 19

Dialysat					Antiseren										Kontr. ₁	Kontr. ₂	Kontr. ₃
Titer	A ₁	A ₂	B	O ₃	Y ₂	A'	E' ₃	C ₂	X ₂	F	V	J ₁	J ₂	Z	NaCl/ Ery.	Kpl.	Lsg.
unverd.	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	5	0	0	0	-	-	-
1/2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	5	0	0	0			
1/4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0			
Kontr. 4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4			

Tab. 19: Hemmungstest mit dem nach Phenolbehandlung gewonnenen Dialysat Nr. 23 aus dem Stroma II des Erythrocyten 115. -
Zahlenerklärung s. Tabelle 1, S. 14

Der Erythrocyt 132 besaß die Blutgruppenfaktoren: B O Y₂ D' E'₃ C W V J M und Z.

In der durch Trypsinbehandlung gewonnenen Lösung Nr. 24 wurde mit der Xanthoproteinreaktion ein starker (++++) und mit der Millonreaktion ein schwacher Gehalt (+) an Eiweißsubstanzen nachgewiesen. Der Hemmungstest führte zu dem in Tabelle 20 wiedergegebenen Ergebnis.

In der durch Vorbehandlung mit Phenol gewonnenen Lösung Nr. 25 wurde sowohl mit der Xanthoprotein- als auch mit der Millon-Reaktion ein starker Gehalt (++++) an Eiweißsubstanzen nachgewiesen. Die Untersuchung dieser Lösung im Hemmungstest zu dem in Tabelle 21 niedergelegten Befunden.

Tabelle 20

Lösung		Antiseren								Kontr. 1		Kontr. 2	Kontr. 3
Titer	O ₃	Y ₂	E ₃	C ₂	W	V	J ₁	J ₂	M	Z	NaCl/Ery.	Kpl.	Lsg.
unverd.	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	-	-	-
1/2	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5			
1/4	5	5	5	5	5	5	5	5	5	4			
1/8	5	5	5	5	3	5	5	4	3	0			
1/16	3	5	4	3	1	2	5	1	2	0			
1/32	1	4	2	1	1	2	5	1	1	0			
1/64	0	3	2	0	0	1	3	0	0	0			
1/128	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0			
Kontr. 4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4			

Tab. 20: Hemmungstest mit der durch Trypsinbehandlung gewonnenen Lösung Nr. 24 aus dem Stroma II des Erythrocyten 132. -
Zahlenerklärung s. Tabelle 1, S. 14

Tabelle 21

Dialysat		Antiseren									Kontr. 1	Kontr. 2	Kontr. 3
Titer	O ₃	Y ₂	E ₃	C ₂	W	V	J ₁	J ₂	M	Z	NaCl/Ery.	Kpl.	Lsg.
unverd.	0	0	0	0	1	5	5	1	1	1	-	-	-
1/2	0	0	0	0	0	5	4	0	0	0			
1/4	0	0	0	0	0	4	4	0	0	0			
Kontr.													
4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4			

Tab. 21: Hemmungstest mit dem nach Phenolbehandlung gewonnenen Dialysat Nr. 25 aus dem Stroma II des Erythrocyten 132. -
Zahlenerklärung s. Tabelle 1, S. 14

Ein Vergleich des im Hemmungstest ermittelten Antigengehaltes der nach den beschriebenen Verfahren hergestellten Lösungen ergibt:

- 1.) Die Hemmwirkung der geprüften Lösungen war in bezug auf die Anzahl der erfaßten Faktoren abhängig von der Verarbeitungsmethode des Ausgangsmaterials. Die nach der Trypsinbehandlung gewonnene Lösung Nr. 22 des Erythrocyten 115 zeigte Hemmwerte gegenüber den Antiseren A₁ A₂ B O₃ Y₂ A' E'₃ C₂ X₂ F V J₁ J₂ und Z, die nach der Phenolbehandlung gewonnene Lösung jedoch nur gegenüber den Antiseren F und V. Die "Trypsin-Lösung" Nr. 24 des Erythrocyten 132 zeigte Hemmwerte gegenüber den Antiseren O₃ Y₂ E'₃ C₂ W V J₁ J₂ M und Z, während das "Phenoldialysat" Nr. 25 nur die Antiseren V und J₁ deutlich beeinflusste.
- 2.) In der Titration zeigten die geprüften Lösungen in bezug auf die Menge der hemmenden Substanzen gleichfalls erhebliche Differenzen. Die komplette Hemmwirkung der "Phenol-Dialysate" ging nicht über die erste Verdünnungsstufe (1/2) hinaus, während die nach der Trypsinmethode hergestellten Lösungen noch in der 5. Verdünnungsstufe (1/32) bei einigen Antiseren zur vollständigen Reaktionshemmung führten, wie die nachfolgende Gegenüberstellung zeigt:

Deutliche Hemmwirkung des "Phenol-Dialysates" aus dem Erythrocyten 115 (F/V)

gegenüber dem Testserum	anti-V	bis zum Titer	1 : 2
"	"	"	anti-F " " "
"	"	"	anti-J " " "
			keine

Deutliche Hemmwirkung der "Trypsin-Lösung" aus dem Erythrocyten 115 (F/V)

gegenüber dem Testserum	anti-V	bis zum Titer	1 : 32
"	"	"	anti-F " " "
"	"	"	anti-J " " "
			1 : 16
			1 : 16

Deutliche Hemmwirkung des "Phenol-Dialysates" aus dem Erythrocyten 132 (V/V)

gegenüber dem Testserum	anti-V	bis zum Titer	1 : 2
"	"	"	anti-J " " "
			1 : 0

Deutliche Hemmwirkung der "Trypsin-Lösung" aus dem Erythrocyten 132 (V/V)

gegenüber dem Testserum	anti-V	bis zum Titer	1 : 8
"	"	"	anti-J " " "
			1 : 32

3.) Im Protein-Nachweis mit chemischen Reagentien zeigten die geprüften Lösungen ebenfalls Reaktionsdifferenzen, wie aus der nachfolgenden Gegenüberstellung hervorgeht:

Reaktionsstärke des "Phenol-Dialysates" aus dem Erythrocyten 115 in der

Xanthoprotein-Reaktion: ++++

Millon-Reaktion: +

Reaktionsstärke der "Trypsin-Lösung" aus dem Erythrocyten 115 in der

Xanthoprotein-Reaktion: ++++

Millon-Reaktion: ++++

Reaktionsstärke des "Phenol-Dialysates" aus dem Erythrocyten 132 in der

Xanthoprotein-Reaktion: ++++

Millon-Reaktion: +

Reaktionsstärke der "Trypsin-Lösung" aus dem Erythrocyten 132 in der

Xanthoprotein-Reaktion: ++++

Millon-Reaktion: ++++

2. Versuch

In der zweiten Versuchsreihe wurde das Stroma der beiden Erythrocyten wie im 1. Versuch mit destilliertem Wasser und Trypsin angesetzt, auf einen pH-Gehalt von 8,5 eingestellt und 2 Stunden im Wasserbad bei 40° C gehalten. In Abweichung zum 1. Versuch wurde danach ein zweites Mal 1 g Trypsin zugesetzt und die Suspension weitere 2 Stunden gehalten und schließlich dieser Vorgang noch einmal wiederholt. Darauf wurde die Suspension abzentrifugiert und die überstehende Flüssigkeit auf ihren Eiweißgehalt geprüft. Die aus dem Erythrocyten gewonnene Lösung Nr. 26 und die aus dem Erythrocyten 132 gewonnene Lösung Nr. 27 zeigten beide eine schwache (+) Millon- und eine starke (++++ Xanthoproteinreaktion.

Die Untersuchung der beiden Lösungen auf blutgruppenspezifische Substanzen führte zu den in den Tabellen 22 und 23 niedergelegten Ergebnissen.

Tabelle 22

Lösung	Antiseren														Kontr. 1	Kontr. 2	Kontr. 3
Titer	A ₁	A ₂	B	O ₃	Y ₂	A'	E' ₃	C ₂	X ₂	F	V	J ₁	J ₂	Z	NaCl/ Ery.	Kpl.	Lsg.
unverd.	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	-	-	-
1/2	5	5	5	5	5	5	5	5	2	5	5	5	5	5			
1/4	3	5	5	5	5	5	5	5	0	5	5	5	5	5			
1/8	1	2	4	5	5	3	4	4	0	5	5	5	1	5			
1/16	0	0	2	3	3	1	2	2	0	5	4	5	1	1			
1/32	0	0	1	2	2	0	1	1	0	3	3	5	0	1			
1/64	0	0	0	1	0	0	0	0	0	3	3	2	0	0			
1/128	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0			
Kontr.																	
4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4			

Tab. 22: Hemmungstest mit der durch wiederholte Trypsinbehandlung gewonnenen Lösung Nr. 26 aus Stroma II des Erythrocyten 115. -
Zahlenerklärung s. Tabelle 1, S. 14

Tabelle 23

Lösung	Antiseren										Kontr. 1	Kontr. 2	Kontr. 3
Titer	O ₃	Y ₂	E' ₃	C ₂	W	V	J ₁	J ₂	M	Z	NaCl/Ery.	Kpl.	Lsg.
unverd.	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	-	-	-
1/2	5	5	5	5	5	5	5	5	4	5			
1/4	3	5	4	3	3	5	5	2	2	1			
1/8	2	5	3	1	1	5	5	1	2	0			
1/16	2	5	3	0	1	4	5	0	2	0			
1/32	1	4	2	0	0	2	4	0	0	0			
1/64	0	2	0	0	0	0	2	0	0	0			
1/128	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0			
Kontr.													
	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4			

Tab. 23: Hemmungstest mit der durch wiederholte Trypsinbehandlung gewonnenen Lösung Nr. 27 aus Stroma II des Erythrocyten 132. -
Zahlenerklärung siehe Tabelle 1, Seite 14.

Ein Vergleich der im 1. und 2. Versuch aus dem Stroma II der Erythrocyten 115 und 132 gewonnenen Lösungen (s. Tab. 18, S. 35 - Tab. 20, S. 36 - Tab. 22, S. 39 und Tab. 23, S. 39) läßt erkennen, daß der wiederholte Fermentzusatz bei der Verarbeitung des Ausgangsmaterials keinen wesentlichen Einfluß auf die Isolierung der im Hemmungstest nachweisbaren Substanzen hatte.

12) Herstellung spezifischer Antiseren durch Immunisierung von Kaninchen mit antigenhaltigen Lösungen

3.) Immunisierungsversuch

Versuchstiere: Für die Immunisierungen wurden Kaninchen von ca. 2 kg Gewicht genommen, in deren Seren bei einer vorausgegangenen Prüfung keine Heteroantikörper gegen Rindererythrocyten nachgewiesen werden konnten.

Immunisierungsmaterial: Als Immunisierungsmaterial dienten die im 1. und 2. Versuch aus den Erythrocyten 115 und 132 hergestellten antigenhaltigen Lösungen Nr. 22 (S. 34), Nr. 24 (S. 34), Nr. 26 und Nr. 27 (S. 38), sowie 2,0 %ige Suspension der unvorbehandelten Erythrocyten 115 und 132 in physiologischer Kochsalzlösung.

Versuchsanordnung: Sechs Versuchsgruppen zu jeweils 2 Kaninchen wurden zur Prüfung der verschiedenen Lösungen und Suspensionen angesetzt. Jedes Tier erhielt 2mal 0,5 ccm und 3mal 1,0 ccm des Immunisierungsmaterials in viertägigen Abständen intravenös verabreicht. Die Seren wurden 4 Tage und 4 Wochen nach der letzten Injektion im Haemolysetest und im Absorptionsversuch ausgewertet.

Das Ergebnis der Untersuchungen ist in Tabelle 24 S. 41 zusammengestellt.

Aus Tabelle 24 ist ersichtlich, daß aus Stroma II der Erythrocyten 115 und 132 durch die Trypsinbehandlung antigenhaltige Lösungen gewonnen wurden, die bei den Versuchstieren zur Bildung blutgruppenspezifischer Immunsereen führten. Es zeigte sich jedoch, daß in diesen Lösungen, deren neutralisierende Wirkung im Hemmungstest gegenüber zahlreichen blutgruppenspezifischen Antikörpern nachgewiesen wurde, nur die spezifische Substanz des Faktors F als Vollantigen enthalten war, da die immunisierten Kaninchen nur F-Antikörper bildeten. Besonders auffällig war, daß die Immunisierung mit der antigenhaltigen Lösung aus dem Erythrocyten 132, der den Faktor F nicht besaß, bei dem Kaninchen Nr. 27 zur Bildung eines anti-F-Serums führte.

Tabelle 24

Versuchs- Gruppe	Immunisierungs- material	Versuchs- tier Nr.	Prüfung der Seren auf Immunantikörper 4 Tage und 4 Wochen nach der letzten Injektion	Titer	
				nach 4 Tagen	nach 4 Wochen
I	Lösung Nr. 22	21	spezifische Antikörper gegen den Faktor F	1 : 2	1 : 4
		22	"	-	1 : 2
II	Lösung Nr. 26	23	keine haemolysierenden Antikörper	-	-
		24	spezifische Antikörper gegen den Faktor F	1 : 16	1 : 8
III	Erythrocyten- Suspension von 115	25	spezifische Antikörper gegen den Faktor F (nach der Absorption mit V/V-Erythrocyten)	1 : 1024	1 : 1024
		26	"	1 : 1024	1 : 1024
IV	Lösung Nr. 24	27	spezifische Antikörper gegen den Faktor F	1 : 4	1 : 4
		28	keine haemolysierenden Antikörper	-	-
V	Lösung Nr. 27	29	keine haemolysierenden Antikörper	-	-
		30	keine haemolysierenden Antikörper	-	-
VI	Erythrocyten- Suspension von 132	31	spezifische Antikörper gegen den Faktor V (nach Absorption mit V/P-Erythrocyten)	1 : 512	1 : 256
		32	"	1 : 1024	1 : 1024

Tab. 24: Ergebnis des 3. Immunisierungsversuches.

Alle Seren dieser Versuchsreihe, die nach der Immunisierung mit antigenhaltigen Lösungen gebildet wurden, haemolysierten nur homozygote F-Erythrocyten.

Anders verhielten sich die Seren der Kaninchen, die zur Kontrolle mit Suspensionen unvorbehandelter Erythrocyten immunisiert worden waren. Im Haemolyse-test reagierten sie in den niederen Verdünnungen mit allen geprüften Erythrocyten. Durch den Absorptionsversuch mit F/F-, F/V- und V/V-Erythrocyten ließ sich nachweisen, daß die Seren der Kaninchen Nr. 25 und Nr. 26 F-Antikörper, die mit F/F- und F/V-Erythrocyten reagierten, und die Seren der Kaninchen Nr. 31 und Nr. 32 V-Antikörper, die nur V/V- und F/V-Erythrocyten haemolysierten, enthielten.

2) Aufschließung mit Papain

21) Herstellung antigenhaltiger Lösungen

Als Ausgangsmaterial diente Stroma II des Erythrocyten 115 mit den Blutgruppens-faktoren: A B O₃ Y₂ A' E'₃ C X₂ F V J und Z. 2 g Stroma II wurden mit 1 g Papain (1 : 350 Merck) und 100 ccm Aqu. dest. zusammengegeben und auf den pH-Gehalt 8,0 eingestellt. Die Mischung wurde 24 Stunden im Brutschrank und anschließend 4 Tage im Kühlschrank bei 4° C aufbewahrt. Danach wurde die Suspension zentrifugiert und die überstehende Flüssigkeit mit der 10-fachen Menge Aceton versetzt. Es entstand ein weißer Niederschlag, der sich innerhalb 24 Std. absetzte. Das überstehende, klare Aceton wurde abgossen und der Bodensatz in physiologischer Kochsalzlösung aufgenommen. Die Lösung gab eine positive (++++) Molischreaktion, eine positive (++++) Xanthoprotein- und eine negative Millin-Reaktion.

Der Gehalt an blutgruppenspezifischen Substanzen wurde im Hemmungstest geprüft (s. Tabelle 25, S. 43).

Nach dem in Tabelle 25 wiedergegebenen Hemmungstest, enthielt die nach Aufschließung mit Papain gewonnene Lösung aus Stroma II des Erythrocyten 115 blutgruppenspezifische Substanzen. Zu Immunisierungsversuchen wurde diese Lösung aus technischen Gründen nicht herangezogen.

Tabelle 25

Lösung													Kontr. 1	Kontr. 2	Kontr. 3
Titer	A ₁	A ₂	O ₃	Y ₂	A'	E' ₃	C ₂	X ₂	F	I ₁	J ₂	Z	NaCl/Ery.	Kpl.	Lsg.
unverd.	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	-	-	-
1/2	5	5	5	2	5	4	2	0	1	5	0	5			
1/4	3	2	2	1	2	1	1	0	0	5	0	3			
1/8	3	2	1	1	1	1	1	0	0	3	0	2			
1/16	2	1	1	0	0	0	0	0	0	1	0	1			
1/32	2	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0			
1/64	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0			
Kontr.	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4			

Tab. 25: Hemmungstest mit der durch Papainbehandlung gewonnenen Lösung Nr. 28 aus Stroma II des Erythrocyten 115. -
Zahlenerklärung s. Tabelle 1, Seite 14.

3) Aufschließung mit Pepsin

31) Herstellung antigenhaltiger Lösungen

Als Ausgangsmaterial diente Stroma I (s. S. 8) des Erythrocyten 132 mit den Blutgruppenfaktoren: B O Y₂ D' E'₃ C W V J M und Z.

3 g Stroma I wurden mit 3 g Pepsin DAB. 5 der Fa. Merck und 50 ccm einer 0,4 %igen HCl-Lösung zusammengegeben und 24 Std. im Brutschrank bei 37° C gehalten. Anschließend wurde die Suspension zentrifugiert und die überstehende Flüssigkeit als Fraktion 1 in der Tiefkühltruhe aufbewahrt. Der Bodensatz wurde erneut mit derselben Menge Pepsin und Salzsäure versetzt und nach 24stündigem Aufenthalt bei 37° C abzentrifugiert. Die überstehende Flüssigkeit wurde abgossen und als Fraktion 2 eingefroren. Der verbleibende Bodensatz wurde noch fünfmal in der gleichen Weise behandelt, so daß schließlich 7 verschiedene Fraktionen zur Verfügung standen. Da bei einer Vorprüfung der einzelnen Fraktionen positive Werte ermittelt werden konnten, wurden die Lösungen 1 bis 7 zusammengegossen und noch einmal im Hemmungstest ausitiert (s. Tab. 26, S. 44). Im chemischen Nachweis gab diese Lösung (Nr. 29) eine negative Millon- und eine positive Xanthoproteinreaktion.

Tabelle 26

Lösung												Kontr. 1	Kontr. 2	Kontr. 3
Titer	O ₁	O ₃	Y ₂	D'	E' ₃	C ₂	V	J ₁	J ₂	M		NaCl/Ery.	Kpl.	Lsg.
unverd.	5	0	0	0	0	0	5	5	5	3		-	-	-
1/2	5	0	0	0	0	0	5	5	5	2				
1/4	3	0	0	0	0	0	5	5	5	0				
1/8	3	0	0	0	0	0	5	5	5	0				
1/16	3	0	0	0	0	0	5	5	5	0				
1/32	0	0	0	0	0	0	0	5	2	0				
1/64	0	0	0	0	0	0	0	5	1	0				
1/128	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0				
1/256	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0				
Kontr.														
	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4				

Tab. 26: Hemmungstest mit der durch fraktionierte Pepsinbehandlung gewonnenen Lösung Nr. 29 aus Stroma I des Erythrocyten 132. -
Zahlenerklärung s. Tabelle 1, S. 14.

Aus Tabelle 26 ergibt sich, daß die aus dem Stroma I des Erythrocyten 132 gewonnene Lösung Nr. 28 blutgruppenspezifische Substanzen der Faktoren V, J und O₁ enthält.

32) Herstellung spezifischer Antiseren durch Immunisierung von Kaninchen mit der Lösung Nr. 29 (s. S. 43).

4. Immunisierungsversuch

Versuchstiere: Für die Immunisierungen wurden Kaninchen von ca. 2 kg Gewicht, in deren Serum bei einer vorausgegangenen Prüfung keine Heteroantikörper gegen Rindererythrocyten nachgewiesen werden konnten.

Immunisierungsmaterial: Als Immunisierungsmaterial diente die antigenhaltige Lösung Nr. 29 (s. S. 43) und eine 2,0 %ige Suspension des unbehandelten Erythrocyten 132 in physiologischer Kochsalzlösung.

Versuchsanordnung: Von der antigenhaltigen Lösung erhielten vier Kaninchen und von der Kontrollsuspension zwei Tiere je 8 Injektionen zu 2,5 ccm in viertägigen Abständen intramuskulär verabreicht. 20 Tage nach der letzten Immunisierung wurden die Seren im Haemolysetest auf spezifische Antikörper untersucht. Tabelle 27 bringt das Ergebnis dieses Immunisierungsversuches.

Tabelle 27

Versuchs- gruppe	Immunisierungs- material	Versuchstier Nr.	Prüfung der Seren auf Immunitätkörper 20 Tage nach der letzten Injektion	Titer
I	Lösung Nr. 29	33	spezifische Antikörper gegen den Faktor F	1 : 64
		34	"	1 : 16
		35	"	1 : 8
		36	"	1 : 8
II	Erythrocyten- Suspension von 132	37	spezifische Antikörper gegen den Faktor V (nach Absorption mit F/F-Erythrocyten)	1 : 512
		38	keine spezifischen haemolysierenden Antikörper	1 : 1024

Tabelle 27: Ergebnis des 4. Immunisierungsversuches

Nach den im Hemmungstest ermittelten Werten war zu erwarten, daß auf die Immunisierung mit der Lösung Nr. 28 des Erythrocyten 132 die Ausbildung von Antikörpern gegen die Faktoren V, J₁, J₂ oder O₁ erfolgen würde. Die neutralisierenden Substanzen dieser Faktoren erwiesen sich jedoch im Tierversuch als nicht antigen. Dagegen bildeten die vier Kaninchen (Nr. 33, Nr. 34, Nr. 35 und Nr. 36) der ersten Versuchsgruppe F-Antikörper, die wie im vorhergehenden Versuch nur mit homozygoten F/F-Erythrocyten reagierten. Der für die Herstellung des Antigens (Lösung Nr. 28) verwendete Erythrocyt 132 vermochte diese Antikörper nicht zu binden.

Die zur Kontrolle mit einer Suspension unvorbehandelter Erythrocyten (132) immunisierten Kaninchen bildeten genau so wie die Kontrolltiere im Trypsinversuch (s. Tab. 24) Antiseren, die in den niederen Verdünnungen mit allen geprüften Erythrocyten reagierten. Durch die Absorption mit F/F- und F/V-Erythrocyten ließen sich in dem Serum Nr. 37 spezifische V-Antikörper nachweisen, die nur V/V- und F/V-Erythrocyten haemolysierten. In dem Serum Nr. 38 konnten spezifische Antikörper nicht nachgewiesen werden.

d) Kombinierte Extraktion und Digestion, Aufschluß von Erythrocytenstroma
_____ durch die Behandlung mit Petroläther, Pepsin und Aceton _____

1) Herstellung antigenhaltiger Lösungen

Aus 5 l Vollblut wurde nach der auf Seite 7 angegebenen Methode Stroma gewonnen und mit 250 ccm Petroläther zwei Stunden bei Zimmertemperatur im Magnetrührer extrahiert. Der braungefärbte Petroläther wurde vom ungelösten Bodensatz abzentrifugiert und im Wasserbad verdampft. Als Rückstand blieb eine dunkelbraune, glänzende Substanz, die in einem Äther-Wasser-Gemisch (1 : 1) gelöst werden konnte. Nach der im Wasserbad erfolgenden Verdampfung des Äthers, blieben weniger stark gefärbte, wasserunlösliche, wachsartige Schollen zurück. Dieser "Reinigungsvorgang" wurde fünfmal wiederholt, bis es zur vollständigen Entfärbung des extrahierten Materials gekommen war. Für die Prüfung auf Anwesenheit blutgruppenspezifischer Substanzen im Hemmungstest und im Tierversuch, sollte der Petrolätherextrakt gelöst werden. Als Lösungsmittel diente wieder das beschriebene Äther-Wasser-Gemisch, die Verdampfung des Äthers im Wasserbad erfolgte diesmal jedoch erst nach Zusatz hochprozentiger Natronlauge. Dadurch gelang es, eine Emulsion herzustellen, die auch bei Einstellung des pH-Gehaltes auf 7,2 erhalten blieb. Diese aus den petrolätherlöslichen Bestandteilen des Erythrocytenstromas gewonnene Emulsion wird im folgenden als Fraktion I bezeichnet.

Dem nach der Petrolätherextraktion des Stromas verbliebenen Bodensatz wurde eine Pepsin-Salzsäurelösung (3 g Pepsin DAB. 5 der Fa. Merck auf 50 ccm einer 0,4 %igen HCl-Lösung) zugesetzt. Diese Mischung wurde so lange im Brutschrank bei 37° C gehalten, bis durch den fermentativen Abbau eine klare, dunkelbraune Lösung entstanden war. Gab man auf 1 Vol. Teil dieser Lösung 20 Vol. Teile Aceton, dann fiel ein großflockiger, weißgrauer Niederschlag aus, der sich innerhalb von 24 Std. am Boden absetzte und von dem überstehenden braungefärbten Aceton getrennt werden konnte. Das Präzipitat wurde zweimal in physiologischer Kochsalzlösung gewaschen und da seine vollständige Lösung nicht gelang, als Suspension im Hemmungstest und im Tierversuch auf die Anwesenheit blutgruppenspezifischer Substanzen geprüft. Diese Suspension wird im folgenden als Fraktion II bezeichnet.

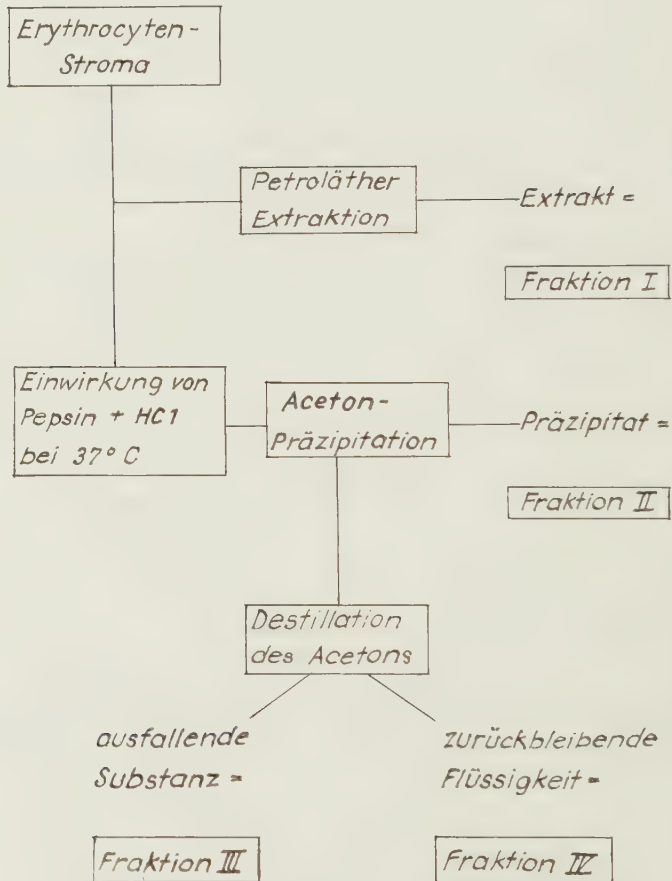
Das von dem Präzipitat abgessene braungefärbte Aceton wurde durch Filtration von Niederschlagsresten befreit und bei Unterdruck und 60° C destilliert. Im Destillationskolben verblieb eine dunkelbraune Flüssigkeit, aus der das restliche Aceton durch Aufkochen entfernt wurde. Hierbei kam es zur Ausscheidung dunkelbrauner Schollen und Flocken, während sich die Flüssigkeit entfärbte. Aus der abgeschiedenen, dunkelbraunen, wachstartigen Substanz ließ sich nach der für die Fraktion I angegebenen Methode (s. S. 46) - durch hochprozentigen Alkalizusatz zu ihrer Lösung in einem Äther-Wasser-Gemisch - ebenfalls eine Emulsion herstellen, die nach der Einstellung des pH-Gehaltes auf 7,2 im Hemmungstest und im Tierversuch auf die Anwesenheit blutgruppenspezifischer Stoffe geprüft wurde. Diese aus den acetonlöslichen Bestandteilen des Erythrocytenstromas gewonnene Emulsion wird im folgenden als Fraktion III bezeichnet.

Die nach der Trennung von den acetonlöslichen Bestandteilen verbleibende hellgelbe, klare Flüssigkeit wurde nach der Einstellung des pH-Gehaltes auf 7,2 im Hemmungstest und im Tierversuch auf blutgruppenspezifische Substanzen untersucht. Diese Lösung wird im folgenden als Fraktion IV bezeichnet.

Eine Darstellung des Verarbeitungsganges ist in Schema I, Seite 48, wiedergegeben.

Nach der beschriebenen Methode wurden die genannten Fraktionen von drei verschiedenen Erythrocyten (Ery. 132, Ery. 369 und Ery. 243) hergestellt. Die Prüfung im Hemmungstest erfolgte in der später als Immunisierungsmaterial verwendeten Form und zwar einmal mit und einmal ohne Schweineserumzusatz. Das Schweineserum wurde hierfür 1 : 3 mit physiologischer Kochsalzlösung verdünnt und mit dem vom Erythrocyten gewonnenen Material im Verhält-

Schema I



Schema I. Schematische Darstellung der Stroma-verarbeitung

nis 1 : 1 gemischt. - Zur Kontrolle wurde gleichzeitig der Einfluß des reinen Schweineserums auf die serologischen Reaktionen im Hemmungstest geprüft.

1. Versuchsreihe

Als Ausgangsmaterial diente Stroma I des Erythrocyten 132 mit den Blutgruppenfaktoren: B O Y₂ D' E₃ C W V J M und Z. Die Fraktionen erhielten die in der nachfolgenden Aufstellung angegebenen Nummern:

Fraktion	mit Schweine- serumzusatz	ohne Schweine- serumzusatz
I	29 a	29 b
II	30 a	30 b
III	31 a	31 b

Die Herstellung der Fraktion IV unterblieb bei diesem Erythrocyten aus technischen Gründen.

Die im Hemmungstest für die einzelnen Lösungen ermittelten Werte sind in den Tabellen 28 bis 34 aufgeführt (s. Anhang). Eine Zusammenstellung dieser Ergebnisse bringt die Tabelle 35 und zwar unter Angabe des Lösungstiters, bei welchem noch alle Antikörper des jeweiligen Testserums neutralisiert wurden (komplette Hemmung). Um die Spezifität der hemmenden Substanzen zu prüfen, wurde die auf Seite 9 unter Nr. 5 beschriebene Kontrolle durchgeführt.

Aus Tabelle 35, S. 50, ist ersichtlich, daß die aus dem Erythrocyten 132 hergestellten Fraktionen zum Teil noch in der dritten Verdünnungsstufe (1 : 8) ausreichend wirksame Substanzen enthielten, um bei der Mehrzahl der eingesetzten Testseren das Reaktionsvermögen aufzuheben. Auffallend war, daß durch den Schweineserumzusatz (Lsg. 29 a, 30 a und 31 a) die Wirksamkeit der neutralisierenden Substanzen offensichtlich gesteigert wurde, obwohl das reine Schweineserum keinen Einfluß auf die Haemolyse hatte.

Die Gegenüberstellung des Wirkungsgrades auf die Faktorensereen (Erythrocyt 132), deren korrespondierende Antigene in den Fraktionen vorhanden sein konnten, und auf Antiseren (Kontrolle 5), deren korrespondierende Antigene nicht zu erwarten waren, zeigte, daß die im Hemmungstest wirksamen Substanzen nicht ausschließlich den im Haemolysetest nachweisbaren Antigenen entsprachen. - Weitere Differenzen ergeben sich im Vergleich des Reaktionsausfalls bei solchen Seren, deren Lysin sich als identisch erwiesen hatte. Dabei stellte sich heraus, daß die Blutkörperchenimmunsereen des Rindes (Anti-A₁ und Anti-F)

Tabelle 55

Stroma-Frak- tionen des Erythrocyten 132	Antiseren gegen Faktoren des Erythrocyten 132												Antiseren gegen Faktoren die der Erythrocyt 132 nicht besaß (Kontrolle 5, s. S. 11)									
	O ₃	Y ₂	D ⁺	E ⁺ ₃	C ₂	W	V	J ₁	J ₂	Z	Rd _{A₁}	Kan _{A₁}	X ₂	Rd _{F₂}	Kan _{F₂}	Ph _{F₂}	p ₁₄₉	p ₅₂₈	S	U ₂		
29 a	1:8	1:8	1:4	1:2	1:4	1:8	0	1:8	1:8	1:8	1:2	1:8	1:2	0	0	1:8	1:8	1:8	1:8	1:4		
29 b	0	0	0	0	1:2	0	0	0	1:4	1:4	0	1:8	0	0	0	1:2	1:8	0	0	0		
30 a	1:2	1:1	1:2	0	0	1:2	1:8	1:8	1:8	1:8	0	1:8	0	0	1:2	1:8	1:8	1:8	1:2	1:2		
30 b	0	0	0	0	0	1:2	1:4	1:8	1:8	1:2	0	1:2	0	0	0	1:8	1:8	1:8	0	0		
31 a	1:2	1:8	1:4	0	1:4	1:8	0	0	0	1:8	0	1:2	0	0	1:2	1:8	1:8	1:4	1:8	1:4		
31 b	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1:8	0	0	0		
Schweine- serum	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		

Tab. 55: Hemmgetiter der Stromafractionen des Erythrocyten 132.

F - Rd.	=	Anti-F-Serum von Rind
F - Kan.	=	Anti-F-Serum vom Kaninchen (immunisiert mit F/F-Erythrocyten)
F - Ph.	=	Anti-F-Serum vom Kaninchen (immunisiert mit Phenoldialysat)
F - 149	=	Anti-F-Serum vom Schaf (immunisiert mit Fraktion 3a des V/V-Erythrocyten 369)
F - 528	=	Anti-F-Serum vom Schaf (immunisiert mit Fraktion 2a des V/V-Erythrocyten 369)
A ₁ - Rd.	=	Anti-A ₁ -Serum vom Rind (immunisiert mit A-Erythrocyten)
A ₁ - Kan.	=	Anti-A ₁ -Serum vom Kaninchen (immunisiert mit Fraktion 1b des Erythrocyten 132)

Tabelle 36

Versuchs-Gruppe	Immunisierungs-material Nr.	Versuchstier Nr.	Prüfung der Seren auf Immunantikörper 8 Tg. nach der letzten Injektion	Nachweis von Lipoid-antikörpern in der Flockungsreaktion
I	29 a	Kan. 39	spez. Antikörper gegen den Faktor F bis Titer 1 : 8	++
		Kan. 40	" " " " F " " 1 : 16	++
		Schf. 1	keine haemolysierenden Antikörper	-
		Schf. 2	" " " "	-
II	29 b	Kan. 41	spez. Antikörper gegen den Faktor A ₁ bis Titer 1 : 8	++
		Kan. 42	keine haemolysierenden Antikörper	-
III	30 a	Kan. 43	haemolysierende Antikörper bis zum Titer 1 : 64	-
		Kan. 44	" " " " " 1 : 32	-
		Kan. 45	" " " " " 1 : 128	-
		Kan. 46	keine haemolysierenden Antikörper	-
IV	30 b	Schf. 3	spez. Antikörper gegen den Faktor F bis Titer 1 : 128	-
		Kan. 47	spez. Antikörper gegen den Faktor F bis Titer 1 : 64	++++
V	31 a	Kan. 48	" " " " F " " 1 : 128	++++
		Kan. 49	" " " " F " " 1 : 64	++++
		Schf. 4	keine haemolysierenden Antikörper	-
VI	31 b	Kan. 50	keine haemolysierenden Antikörper	-
		Kan. 51	" " " "	-
		Kan. 52	" " " "	-
VII	Schweineserum	Kan. 53	keine haemolysierenden Antikörper	-
		Kan. 54	" " " "	-

Tab. 36: Ergebnis des 5. Immunisierungsversuches.

und des Kaninchens (Anti-F) schwach oder gar nicht gehemmt wurden, während bei den Extraktimmunseren des Kaninchens (Anti-A₁-Kan. und Anti-F-Ph) und des Schafes (Anti-F-149 und Anti-F-528) Hemmwerte bis zum Lösungstiter 1 : 8 nachgewiesen werden konnten.

Nach den im Hemmungstest ermittelten Werten mußte das Vorhandensein spezifischer Substanzen der im nachfolgenden aufgeführten Blutgruppenfaktoren in den einzelnen Fraktionen angenommen werden:

Fraktion	spezifische Substanz des Blutgruppenfaktors:													
I	O ₃	Y ₂	D'	E' ₃	C ₂	W	J ₁	J ₂	Z	A ₁	X ₂	F	S	U ₂
II	O ₃	Y ₂	D'		W	V	J ₁	J ₂	Z	A ₁		F	S	U ₂
III	O ₃	Y ₂	D'		C ₂	W		Z	A ₁		F	S		U ₂

Von diesen Substanzen waren im Haemolysetest an dem unvorbehandelten Erythrocyten 132 nicht nachweisbar gewesen die Blutgruppenfaktoren: A₁, X₂, F, S und U₂.

- 2) Herstellung spezifischer Antiseren durch Immunisierung von Kaninchen und Schafen mit den antigenhaltigen Fraktionen I bis III des Erythrocyten 132

5. Immunisierungsversuch

Versuchstiere: Für die Immunisierungen wurden Kaninchen von ca. 2 kg Gewicht genommen, in deren Seren keine Heteroantikörper gegen Rindererythrocyten nachgewiesen werden konnten. Die Seren der Versuchsschafe wurden in gleicher Weise geprüft.

Immunisierungsmaterial: Die Lösungen Nr. 29 a, 29 b, 30 a, 30 b, 31 a und 31 b sollten auf ihren Antigengehalt geprüft werden, als Kontrolle diente 1 : 3 mit physiologischer Kochsalzlösung verdünntes Schweineserum.

Versuchsanordnung: Sieben Versuchsgruppen wurden zur Prüfung der verschiedenen Lösungen angesetzt. Die Immunisierungen erfolgten in viertägigen Abständen und zwar erhielt jedes Kaninchen 8mal 2 ccm und jedes Schaf 8mal 5 ccm des jeweiligen Immunisierungsmaterials intravenös verabreicht. Acht Tage nach der letzten Injektion wurden die Seren auf ihren Antikörpergehalt im Haemolysetest und in der Flockungsreaktion geprüft. In Tabelle 36 S. 51 ist das Ergebnis dieses Versuches wiedergegeben.

Aus Tabelle 36 ergibt sich, daß von den Versuchstieren nur solche Antikörper gebildet wurden, deren korrespondierende Antigene bei dem unbehandelten

Erythrocyten, von welchem das Immunisierungsmaterial gewonnen wurde, nicht nachgewiesen werden konnten. (Antikörper gegen den Faktor A_1 von Kaninchen Nr. 41, Antikörper gegen den Faktor F von den Kaninchen Nr. 39, 40, 47, 48, 49 und dem Schaf Nr. 3.) Eine Übereinstimmung besteht jedoch mit den im Hemmungstest ermittelten Werten, da hier durch das Immunisierungsmaterial die Antikörper der Faktorenseren Anti- A_1 und Anti-F neutralisiert wurden. Für die im serologischen Test nachgewiesenen Substanzen der übrigen Faktoren (s. Tab. 35) konnte der Beweis ihrer antigenen Wirksamkeit durch diesen Tierversuch nicht erbracht werden. -

Die von den Tieren der Versuchsgruppe III (Kan. Nr. 43, 44 und 45) gebildeten Antikörper ließen keine Blutgruppenspezifität erkennen. Sie reagierten im Haemolysetest mit allen Erythrocyten bis zur angegebenen Titerhöhe gleich stark. Im Absorptionsversuch wurden sie durch Rinderblutkörperchen vollständig entfernt, während die Absorption mit Schaferythrocyten lediglich zur Titersenkung des behandelten Serums führte.

Eine Beeinflussung der antigenen Wirksamkeit des Immunisierungsmaterials durch den Zusatz von verdünntem Schweineserum zeigte sich nur in den Versuchsgruppen V und VI. Die acetonlösliche Fraktion (III) des Ausgangserythrocyten erwies sich ohne Schweineserumzusatz als nicht antigen (Kan. Nr. 50, 51 und 52), während die Tiere Nr. 47, 48 und 49 auf die Immunisierung mit Fraktion III + Schweineserum spezifische Antikörper bildeten. - In der Flockungsreaktion zeigten sich positive Werte nur bei den Antiseren aus den Versuchsgruppen I, II und V, die nach der Immunisierung mit Fraktion I (Petrol-Äther-Extrakt) und Fraktion III (acetonlösliche Bestandteile) des Erythrocyten 132 gebildet worden waren. Keine Reaktionen zeigten die Antiseren der Tiere Nr. 43, 44, 45 und 3, welche als Antigen die Fraktion II (Aceton-Präzipitat) des Erythrocyten 132 erhalten hatten.

Die in der Kontrollgruppe bei den Kaninchen Nr. 53 und 54 vorgenommene Immunisierung mit verdünntem Schweineserum führte nicht zur Ausbildung haemolysierender oder flockender Antikörper.

2. Versuchsreihe

Als Ausgangsmaterial diente Stroma I des Erythrocyten 369 mit den Blutgruppenfaktoren: A , O_3 , Y_2 , A' , C_2 , W , X_2 , V , J und M .

Die Fraktionen erhielten die in der nachfolgenden Aufstellung angegebenen Nummern:

Fraktion	mit Schweine- serumzusatz	ohne Schweine serumzusatz
I	32 a	32 b
II	33 a	33 b
III	34 a	34 b
IV	35 a	35 b

Eine Zusammenfassung der für die einzelnen Lösungen ermittelten Hemmwerte (s. Anhang Tab. 37 - 45) bringt Tabelle 46. Es sind hier, wie in Tabelle 35, die Lösungstiter aufgeführt, mit welchen noch eine komplette Hemmung erreicht wurde.

Aus der Tabelle 46 S. 55 ist zu ersehen, daß in den Fraktionen des Erythrocyten 369 spezifische Substanzen der Blutgruppenfaktoren Y_2 , W, J, E'_1 und F in serologisch nachweisbarer Menge vorhanden waren. Eine deutliche Steigerung der neutralisierenden Wirkung durch den Schweineserumzusatz zeigte sich gegenüber den Antikörpern der Testseren Anti- Y_2 , Anti-W und Anri-F, obwohl das reine Schweineserum als hemmendes Medium keinen Einfluß auf die Haemolyse hatte.

Ein Vergleich der Hemmwirkung gegenüber den spezifischen Antikörpern des Erythrocyten 369 und jenen Antikörpern, die mit dem unvorbehandelten Ausgangserythrocyten keine Reaktion gaben (Kontrolle 5), zeigte, daß in den Fraktionen nicht nur die im Haemolysetest nachweisbaren Antigene des Erythrocyten 369, sondern auch noch weitere spezifisch hemmende Substanzen enthalten waren. - Den in Tabelle 35 festgelegten Befunden entsprechend wurde auch hier eine unterschiedliche Beeinflussung der Immunsereen verschiedener Herkunft festgestellt. Die Blutkörperchenimmunsereen des Rindes und des Kaninchens (Anti-F-Rd. und Anti-F-Kan.) erfuhren durch die Fraktionen I - IV keine Beeinträchtigung ihrer Reaktionsstärke, während die Antikörper der Extraktimmunsereen des Kaninchens und des Schafes (Anti-F-Ph., Anti-F-149 und Anti-F-528) neutralisiert wurden.

Nach den im Hemmungstest ermittelten Werten mußte das Vorhandensein spezifischer Substanzen der im nachfolgenden aufgeführten Blutgruppenfaktoren in den einzelnen Fraktionen angenommen werden:

Tabelle 46

Stromafraktionen des Erythrocyten 369	Antiseren gegen Faktoren des Erythrocyten 369										Antiseren gegen Faktoren, die der Erythrocyt 369 nicht besaß (Kontrolle 5, s. S. 11)										
	A ₁	A ₂	Y ₂	C ₂	W	X ₂	V	P ¹	J ₁	J ₂	E ¹	E ²	E ³	Rd	Kan	P ^h	F ¹⁴⁹	F ⁵²⁸	L	S	Z
32 a	0	0	1:4	0	0	0	0	0	1:8	1:8	1:2	0	0	0	0	1:8	1:8	1:8	0	0	0
32 b	0	0	0	0	0	0	0	0	1:8	1:4	0	0	0	0	0	1:2	1:8	1:2	0	0	0
33 a	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1:8	1:8	1:8	0	0	0
33 b	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1:8	1:8	1:2	0	0	0
34 a	0	0	1:4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1:8	1:8	1:8	0	0	0
34 b	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1:4	1:8	0	0	0	0
35 a	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1:4	1:8	0	0	0	0
35 b	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1:4	0	0	0	0	0
Schweine-serum	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Tab. 46: Hemmungstiter der Stromafaktionen des Erythrocyten 369

Zeichenerklärung siehe Tab. 35.

Fraktion	spezifische Substanz des Blutgruppenfaktors				
I	Y ₂	W	J	E' ₁	F
II	F				
III	Y ₂	F			
IV	F				

Von diesen Substanzen waren im Haemolysetest an dem unvorbehandelten Erythrocyten 369 nicht nachweisbar gewesen die Blutgruppenfaktoren: E'₁ und F.

- 3) Herstellung spezifischer Antiseren durch Immunisierung von Kaninchen und Schafen mit den antigenhaltigen Fraktionen I bis IV des Erythrocyten 369

6. Immunisierungsversuch

Versuchstiere: Für die Immunisierung wurden Kaninchen von ca. 2 kg Gewicht genommen, in deren Serum keine Heteroantikörper gegen Rindererythrocyten nachgewiesen werden konnten. Die Seren der Versuchsschafe wurden in gleicher Weise geprüft.

Immunisierungsmaterial: Die Lösungen Nr. 32 a, 32 b, 33 a, 33 b, 34 a, 34 b, 35 a und 35 b sollten auf ihren Antigengehalt geprüft werden, als Kontrolle diente 1 : 3 mit physiologischer Kochsalzlösung verdünntes Schweineserum und eine 2,0 %ige Suspension des Erythrocyten 369 in physiologischer Kochsalzlösung.

Versuchsanordnung: Zehn Versuchsgruppen wurden zur Prüfung der verschiedenen Lösungen angesetzt. Die Immunisierungen erfolgten in viertägigen Abständen und zwar erhielt jedes Kaninchen 8mal 2 ccm und jedes Schaf 8mal 5 ccm des jeweiligen Immunisierungsmaterials intravenös verabreicht. Acht Tage nach der letzten Injektion wurden die Seren auf ihren Antikörpergehalt im Haemolysetest und in der Flockungsreaktion geprüft. Tabelle 47 S. 56 a zeigt das Versuchsergebnis.

Aus Tabelle 47 ist zu ersehen, daß von den im Hemmungstest nachgewiesenen neutralisierenden Substanzen (s. Tab. 46) nur für den Faktor F der Beweis seiner immunisierenden Fähigkeit erbracht werden konnte (Kan. Nr. 37 - 57, Nr. 78 und Schaf Nr. 5 und Nr. 6). Das F-Antigen war bei dem Ausgangserythrocyten im Haemolysetest nicht nachweisbar, eine Bindung zwischen Erythrocyt 369 und diesen Extraktantikörpern trat nicht ein. - Im Gegensatz dazu bildete das Kaninchen Nr. 55 nach der Immunisierung mit dem Petrolätherextrakt ein spezifisches Anti-V-Serum, obwohl die neutralisierende Substanz dieses Faktors im Hemmungstest nicht nachgewiesen wurde (s. Tab. 46).

Tabelle 47

Versuchs- gruppe	Immu- sierungs- material Nr.	Versuchs- tier Nr.	Prüfung der Seren auf Immunantikörper 8 Tage nach der letzten Injektion	Nachweis von Lipoid- antikörpern in der Flockungsreaktion
I	32 a	Kan. 55 Kan. 56 Kan. 57 Kan. 58	Nachweis von blutgruppenspezifischen Antikörpern spez. Antikörper gegen den Faktor V bis Titer 1 : 16 " " " " F " " 1 : 32 " " " " F " " 1 : 32 " " " " F " " 1 : 128	+ + + +
II	32 b	Kan. 59 Kan. 60 Kan. 61 Kan. 62	spez. Antikörper gegen den Faktor F bis Titer 1 : 64 " " " " F " " 1 : 16 " " " " F " " 1 : 16 " " " " F " " 1 : 32	+ + + +
III	33 a	Kan. 63 Kan. 64 Kan. 65 Kan. 66 Schf. 5	spez. Antikörper gegen den Faktor F bis Titer 1 : 16 " " " " F " " 1 : 16 " " " " F " " 1 : 32 " " " " F " " 1 : 16 " " " " F " " 1 : 16	- - - - -
IV	33 b	Kan. 67 Kan. 68 Kan. 69 Kan. 70	spez. Antikörper gegen den Faktor F bis Titer 1 : 16 " " " " F " " 1 : 8 " " " " F " " 1 : 32 " " " " F " " 1 : 16	- - - -
V	34 a	Kan. 71 Kan. 72 Kan. 73 Kan. 74 Schf. 6	spez. Antikörper gegen den Faktor F bis Titer 1 : 32 " " " " F " " 1 : 64 " " " " F " " 1 : 32 " " " " F " " 1 : 32 " " " " F " " 1 : 8	++++ ++++ ++++ ++++ ++++
VI	34 b	Kan. 75 Kan. 76 Kan. 77 Kan. 78	keine haemolysierenden Antikörper " " " " " " " " " " spez. Antikörper gegen den Faktor F bis Titer 1 : 8	- - - ++
VII	35 a	Kan. 79 Kan. 80 Kan. 81 Kan. 82	keine haemolysierenden Antikörper " " " " " " " " " " " " " " "	- - - -
VIII	35 b	Kan. 83 Kan. 84 Kan. 85 Kan. 86	keine haemolysierenden Antikörper " " " " " " " " " " " " " " "	- - - -
IX	Schweine- serum	Kan. 87 Kan. 88	keine haemolysierenden Antikörper " " " " "	- -
X	2 %ige Ery- throcyten- Suspension von 369	Kan. 89 Kan. 90	spez. Antikörper gegen den Faktor V bis Titer 1 : 256 " " " " V " " 1 : 128	- -

Tab. 47: Ergebnis des 6. Immunisierungsversuches.

Eine Steigerung der antigenen Wirksamkeit des isolierten Materials durch den Schweineserumzusatz zeigte sich nur bei den Tieren der Versuchsgruppen V und VI, die mit der acetonlöslichen Fraktion (III) immunisiert worden waren. Die Injektion von Fraktion III + Schweineserum führte ausnahmslos zur Bildung spezifischer Antikörper (Kan. Nr. 71 - 74 und Schaf Nr. 6), während nach der Immunisierung mit Fraktion III ohne Schweineserum nur eines von vier Tieren (Kan. Nr. 78) ein Antiserum produzierte.

Im Flockungstest reagierten nur die Seren der Gruppen I, II, V und VI, die nach der Immunisierung mit Fraktion I (Petroläther-Extrakt) und Fraktion III (acetonlösliche Bestandteile) entstanden waren. Keine Reaktion zeigten dagegen die Seren der Tiere, welche die Fraktion II (Aceton-Präzipitat) und Fraktion IV (wasserlösliche Bestandteile) erhalten hatten. Die in der Kontrollgruppe IX mit Schweineserum immunisierten Kaninchen Nr. 87 und Nr. 88 bildeten weder haemolysierende noch flockende Antikörper. - In den Seren der Kaninchen Nr. 89 und Nr. 90 (Gruppe X), die eine 2,0 %ige Suspension des Erythrocyten 369 erhalten hatten, wurden nach der Absorption mit V-negativen Erythrocyten spezifische V-Antikörper nachgewiesen. In der Flockenreaktion waren diese Blutkörperchenimmuneren im Gegensatz zu dem Anti-V-Extraktserum (Kan. Nr. 55) negativ.

3. Versuchsreihe

Als Ausgangsmaterial diente der Erythrocyt 243 mit den Blutgruppenfaktoren: A, Y₂, E₃, F und U₂.

Die Fraktionen erhielten die in der nachfolgenden Aufstellung angegebenen Nummern:

Fraktion	mit Schweine- serumzusatz	ohne Schweine- serumzusatz
I	36 a	36 b
II	37 a	37 b
III	38 a	38 b
IV	39 a	39 b

Die Zusammenstellung der für die einzelnen Fraktionen ermittelten Hemmwer-te (s. Anhang Tab. 48 - 56) bringt die Tabelle 57, S. 58. Den Angaben der Tabellen 35 und 46 entsprechend sind die Lösungstiter aufgeführt, die noch eine komplette Hemmung des jeweiligen Testserums verursachten.

Tabelle 57

Stromafraktionen des Erythrocyten 243	Antiseren gegen Faktoren des Erythrocyten 243										Antiseren gegen Faktoren, die der Erythrocyt 243 nicht besaß (Kontroll 5, s. S. 11)									
	A	Y ₂	E' 3	F _d	F _{Kan}	F _{Ph}	F ¹⁴⁹	F ⁵²⁸	U ₂	I	O ₂	X ₂	V	J ₁	J ₂	L	S	Z		
36 a	0	0	1:2	0	0	1:2	1:8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
36 b	0	0	0	0	0	0	1:4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
37 a	0	0	1:2	0	1:2	1:8	1:8	1:8	0	0	0	0	0	1:2	1:2	0	0	0		
37 b	0	0	0	0	0	1:8	1:8	1:2	0	0	0	0	0	1:2	1:2	0	0	0		
38 a	1:2	1:4	1:8	0	1:2	1:2	1:8	1:2	0	1:4	0	0	0	0	0	1:2	1:2	1:2		
38 b	1:2	0	0	0	0	0	1:8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
39 a	0	0	0	0	0	1:8	1:8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
39 b	0	0	0	0	0	0	1:4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
Schweine-serum	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		

Tab. 57: Hemmungstiter der Stromafaktionen des Erythrocyten 243

Zeichenerklärung s. Tab. 35.

Die Tabelle 57 zeigt, daß die Fraktionen des Erythrocyten 243 spezifisch hemmende Substanzen enthielten, die nicht nur den Antigenen des Ausgangserythrocyten entsprachen, sondern auch solche Antikörper neutralisierten, die mit dem Erythrocyten 243 keine Reaktion zeigten (Kontrolle 5). - Eine deutliche Steigerung der Hemmwirkung der Fraktionen durch den Schweineserumzusatz zeigte sich auch hier, wie in den vorhergehenden Versuchen, gegenüber der Mehrzahl der Testseren, obwohl das reine Schweineserum die Reaktionsstärke der Seren nicht herabsetzte.

Bei den Antiseren, deren Lysin sich als identisch erwiesen hatte, konnte eine unterschiedliche Beeinflussung durch die Fraktionen festgestellt werden. Die Antikörper der Extraktimmunsere von Kaninchen und Schaf (Anti-F-Ph., Anti-F-149 und Anti-F-528) wurden im Hemmungstest weitgehend neutralisiert, während das Blutkörperchenimmunsere des Kaninchens (Anti-F-Kan.) in seiner Reaktionsfähigkeit nur geringgradig herabgesetzt wurde, und das Blutkörperchenimmunsere des Rindes (Anti-F-Rd.) mit den vom Erythrocyten 243 isolierten Substanzen keine Reaktion zeigte, obwohl seine Antikörper den unbehandelten Erythrocyten haemolysierten.

Nach den im Hemmungstest ermittelten Werten mußte das Vorhandensein spezifischer Substanzen der im nachfolgenden aufgeführten Blutgruppenfaktoren in den einzelnen Fraktionen angenommen werden:

Fraktion	spezifische Substanz des Blutgruppenfaktors:									
I	E ₃	F								
II	E ₃	F	J							
III	A	Y ₂	E ₃	F	I	X ₂	L	S	Z	
IV	F									

Von diesen Substanzen waren im Haemolysetest an dem unvorbehandelten Erythrocyten 243 nicht nachweisbar gewesen die Blutgruppenfaktoren: J, I, X₂, L, S und Z.

4) Herstellung spezifischer Antiseren durch Immunisierung von Kaninchen mit den antigenhaltigen Fraktionen I bis IV des Erythrocyten 243

7. Immunisierungsversuch

Versuchstiere: Für die Immunisierungen wurden Kaninchen von ca. 2 kg Gewicht genommen, in deren Seren bei einer vorausgegangenen Prüfung keine Heteroantikörper gegen Rindererythrocyten nachgewiesen werden konnten.

Immunisierungsmaterial: Die Lösungen Nr. 36 a, 36 b, 37 a, 37 b, 38 a, 38 b, 39 a und 39 b sollten auf ihren Antigengehalt geprüft werden. Als Kontrolle diente 1 : 3 mit physiologischer Kochsalzlösung verdünntes Schweineserum und eine 2,0 %ige Suspension des Erythrocyten 243 in physiologischer Kochsalzlösung.

Versuchsanordnung: Zehn Versuchsgruppen wurden zur Prüfung der verschiedenen Lösungen angesetzt. Die Immunisierungen erfolgten in viertägigen Abständen und zwar erhielt jedes Kaninchen 8mal 2 ccm des jeweiligen Immunisierungsmaterials intravenös verabreicht. Acht Tage nach der letzten Injektion wurden die Seren auf ihren Antikörpergehalt im Haemolysetest und in der Flockungsreaktion geprüft. Tabelle 58 S. 60 a gibt das Versuchsergebnis wieder.

Aus Tabelle 58 ist zu ersehen, daß von den im Hemmungstest (Tab. 57) ermittelten spezifischen Substanzen nur solche zur Antikörperproduktion beim Versuchstier führten, die auch am unvorbehandelten Erythrocyten 243 im Haemolysetest nachgewiesen werden konnten (Antigene der Faktoren A und F). Die Bildung der A_1 -Antikörper bei den Kaninchen Nr. 102, 103 und 104 nach der Immunisierung mit Fraktion II erfolgte, obwohl die neutralisierende Substanz des Faktors A in diesem Immunisierungsmaterial nicht nachgewiesen werden konnte (s. Tab. 57).

Eine Steigerung der antigenen Wirksamkeit der Fraktionen durch den Zusatz von Schweineserum zeigte sich, wie in den vorausgegangenen Versuchsreihen, nur in den Gruppen V und VI. Die aus den acetonlöslichen Bestandteilen des Erythrocyten 243 hergestellte Fraktion III erwies sich ohne Schweineserumzusatz als nicht antigen. Auf die Immunisierung mit Fraktion III + Schweineserum kam es zur Bildung von Antiseren, deren haemolisierende Antikörper jedoch - mit einer Ausnahme (Kan. Nr. 110) - nur mit einigen der Standard-Erythrocyten reagierten, ohne eine Gruppenspezifität erkennen zu lassen.

Der Nachweis flockender Antikörper gelang nur bei den Seren der Gruppen I, II und V, die auf die Immunisierung mit Fraktion I (Petroläther-Extrakt) und Fraktion III (acetonlösliche Bestandteile) entstanden waren.

Die zur Kontrolle mit Schweineserum immunisierten Kaninchen Nr. 123 und Nr. 124 bildeten weder haemolisierende noch flockende Antikörper. - In den Seren der Kaninchen Nr. 125 und Nr. 126, die eine 2,0 %ige Suspension des Erythrocyten 243 erhalten hatten, wurden nach der Absorption mit F-negativen Erythrocyten spezifische F-Antikörper nachgewiesen. Diese zeigten jedoch im Gegensatz zu den Anti-F-Extraktseren der Gruppen I, II und V keine Reaktion im Flockentest.

Tabelle 58

Versuchs- gruppe	Immu- sierungs- material Nr.	Versuchs- tier Nr.	Prüfung der Seren auf Immunantikörper 8 Tg. nach der letzten Injektion	Nachweis von Lipoid- antikörpern in der Flockungsreaktion
I	36 a	Kan. 91 Kan. 92 Kan. 93 Kan. 94	Nachweis von blutgruppenspezifischen Antikörpern im Haemolysetest spez. Antikörper gegen den Faktor F bis Titer 1 : 16 " " " " F " " 1 : 8 " " " " F " " 1 : 32 " " " " F " " 1 : 16	+ + + ++
II	36 b	Kan. 95 Kan. 96 Kan. 97 Kan. 98	spez. Antikörper gegen den Faktor F bis Titer 1 : 16 " " " " F " " 1 : 16 " " " " F " " 1 : 4 keine haemolysierenden Antikörper	++ + + -
III	37 a	Kan. 99 Kan. 100 Kan. 101 Kan. 102	spez. Antikörper gegen den Faktor F bis Titer 1 : 32 " " " " F " " 1 : 32 " " " " F " " 1 : 16 " " " " F + A ₁ " " 1 : 32	- - - -
IV	37 b	Kan. 103 Kan. 104 Kan. 105 Kan. 106	spez. Antikörper gegen den Faktor F+A ₁ bis Titer 1 : 32 " " " " F+A ₁ " " 1 : 128 " " " " F " " 1 : 32 " " " " F " " 1 : 32	- - - -
V	38 a	Kan. 107 Kan. 108 Kan. 109 Kan. 110	haemolysierende Antikörper " " " " bis Titer 1 : 16 " " " " " 1 : 4 " " " " " 1 : 4 " " " " " 1 : 4	+++ +++ +++ +++
VI	38 b	Kan. 111 Kan. 112 Kan. 113 Kan. 114	keine haemolysierenden Antikörper " " " " " " " " " " " "	- - - -
VII	39 a	Kan. 115 Kan. 116 Kan. 117 Kan. 118	keine haemolysierenden Antikörper " " " " " " " " " " " "	- - - -
VIII	39 b	Kan. 119 Kan. 120 Kan. 121 Kan. 122	keine haemolysierende Antikörper " " " " " " " " " " " "	- - - -
IX	Schweine- serum	Kan. 123 Kan. 124	keine haemolysierende Antikörper " " "	- -
X	2,0 %ige Erythrocyten- Suspension von 243	Kan. 125 Kan. 126	spez. Antikörper gegen den Faktor F bis Titer 1 : 512 " " " " F " " 1 : 256	- -

Tab. 58: Ergebnis des 7. Immunisierungsversuches.



5) Zusammenfassung der Ergebnisse aus den Versuchsreihen 1 - 3. (5. bis 7. Immunisierungsversuch)

Durch die successive Behandlung mit Petroläther, Pepsin und Aceton konnte das Erythrocytenstroma in Fraktionen zerlegt werden, die sich in chemischer Hinsicht durch ihre Löslichkeit (äther- bzw. acetonlöslich: Fraktion I bzw. Fraktion III, wasserlöslich: Fraktion II und Fraktion IV) und im serologischen Test durch das Auftreten (Fraktion I und III) oder Fehlen (Fraktion II und IV) flockender Extraktantikörper in Immunseren unterschieden. Die Produktion haemolisierender blutgruppenspezifischer Antikörper erfolgte unabhängig von den genannten Eigenschaften und stand nicht in allen Fällen in Übereinstimmung mit den im Reagenzglasversuch (Hemmungstest) erhaltenen Ergebnissen (Tab. 46 und Tab. 47: Faktor V, Tab. 57 und Tab. 58: Faktor A). Nach dem beschriebenen Verfahren konnten Antigene gewonnen werden, die am unbehandelten Erythrocyten im Haemolysetest nicht nachzuweisen waren (Tab. 35 und Tab. 36: Faktor A₁ und Faktor F, Tab. 46 und Tab. 47: Faktor F) und beim Versuchstier zur Ausbildung von Antikörpern führten, die mit dem Ausgangserythrocyten keine Reaktion zeigten.

Ferner wurden bei Immunseren verschiedener Herkunft, deren Lysin sich als identisch erwiesen hatte, im Hemmungstest Reaktionsunterschiede festgestellt. Die Neutralisierung der Antikörper durch die vom Erythrocyten isolierten Substanzen erfolgte bei den Extraktimmunseren in allen Fällen, während die Antikörper der Blutkörperchenimmunseren vom Rind und Kaninchen nur in einigen Fällen geringfügig beeinflußt wurden. Entsprechend waren die Reaktionen im Flockungstest. Die Extraktseren zeigten starke Reaktionen, während in den Blutkörperchenimmunseren keine flockenden Antikörper nachgewiesen wurden, obwohl der Titer ihrer haemolisierenden Antikörper wesentlich höher war. In den Seren der Kaninchen, die mit reinem Schweineserum immunisiert worden waren, konnten weder im Haemolysetest noch in der Flockungsreaktion Antikörper nachgewiesen werden.

IV. DISKUSSION

In Übereinstimmung mit bereits vorliegenden Befunden zahlreicher Autoren (3, 8, 9, 13, 16, 17, 23, 25, 40, 43, 52) konnte in den Immunisierungsversuchen 1 - 7 bewiesen werden, daß die Trennung der blutgruppenspezifischen Substanzen von den arteigenen Proteinen des Erythrocyten auf verschiedenen Wegen möglich ist. Die Isolierung der spezifischen Substanzen gelang durch die Behandlung mit Phenol, die enzymetische Digestion und die Extraktion mit den organischen Lösungsmitteln Petroläther und Aceton.

Ausgehend von der Phenol-Methode nach Mitscherlich und Liess (32) konnten in mehreren Versuchsreihen aus Erythrocytenstroma Lösungen blutgruppenspezifischer Antigene gewonnen werden. Eine mehrtägige Einwirkungsdauer des Phenols im sauren bis neutralen Bereich erwies sich dabei als erforderlich. In der Nacharbeitung gleichartiger Methoden anderer Autoren (35, 48) konnte eine Verbesserung dieser Resultate nicht erreicht werden. - Der enzymatische Eiweißabbau, von Kabat (22) für die Isolierung gruppenspezifischer Stoffe aus Geweben angewandt, wurde mit den Fermenten Trypsin, Papain und Pepsin durchgeführt. Die Herstellung antigenhaltiger Präparate war auch nach diesen Verfahren möglich. Es bestand demnach keine Übereinstimmung mit der von Jorpes und Norlin (21) geäußerten Ansicht, daß bei der enzymatischen Proteolyse auch die Blutgruppeneigenschaften dem fermentativen Abbau unterliegen. - Die Petrolätherextraktion und die Anwendung von Aceton zur Herstellung verschiedener Erythrocytenfraktionen erwiesen sich ebenfalls als brauchbar für die Gewinnung antigenhaltiger Extrakte.

Aus den verschiedenen Verarbeitungsverfahren ergibt sich in chemischer Hinsicht eine Beurteilungsmöglichkeit der Hauptbestandteile des isolierten Materials. Danach lassen sich die durch Extraktion mit Petroläther und Aceton gewonnenen lipoidreichen von den durch Präzipitation mit Aceton gewonnenen eiweißreichen Erythrocytenfraktionen trennen. Eine Bestätigung hierfür findet sich in den Ergebnissen der Flockungsreaktion. Nur die aus den äther- oder acetonlöslichen Bestandteilen des Erythrocyten entstandenen Antiseren zeigten positive Werte, in den Präzipitat-Antiseren konnten keine flockenden Lipoidantikörper nachgewiesen werden.

Über den Gehalt an gruppenspezifischen Stoffen sowohl in dem lipoidreichen als auch in dem eiweißreichen Anteil des Erythrocytenstromas haben Brahn und Schiff (3) und Landsteiner und van der Scheer (24) berichtet. Aus den Untersuchungen von Calvin (6) ist bekannt, daß zwar der Hauptan-

teil der spezifischen Substanzen im lipoidreichen Elinin enthalten ist, daß aber auch im eiweißreichen Stromatin Faktoren-Antigene nachgewiesen werden können. Die Prüfung der Erythrocytenpräparate auf ihren Antigengehalt erfolgte im Hemmungstest. Durch die Neutralisierung bekannter Antikörper sollte die Anwesenheit der korrespondierenden Antigene bewiesen werden. Es stellte sich bei diesen Versuchen jedoch heraus, daß die Extraktwirkung auf identische Antifaktorenseren verschiedener Herkunft nicht übereinstimmend war. Die Antikörper der durch Erythrocyteninjektion erzeugten Seren des Rindes und des Kaninchens wurden entweder gar nicht oder nur geringgradig beeinflusst. Ein Vergleich mit den Ergebnissen im Flockungstest, in welchem die Blutkörperchenimmunsere negativ, die Extraktseren jedoch positiv reagierten, läßt die Annahme zu, daß bei der Bindung von Extraktantigenen im Hemmungstest der Anteil der Lipoidantikörper eine Rolle spielt. Der Mangel dieser Antikörper in den Erythrocytenimmunsere läßt darauf schließen, daß die korrespondierenden Lipoidantigene am unbehandelten Erythrocyten fehlen oder nur in geringer Menge vorhanden sind. Erst durch die Extraktion werden diese Antigene freigelegt oder in ausreichend konzentrierter Form gewonnen, um eine Antikörperbildung hervorzurufen. Neben diesen lipoiden konnten auch blutgruppenspezifische Antigene in den Extrakten nachgewiesen werden, die der Erythrocyt im Haemolysetest nicht zeigte.

Da das spezifische Neutralisationsvermögen im Hemmungstest nicht gleichbedeutend ist mit der immunogenen Fähigkeit der wirksamen Substanzen, wurde durch den Tierversuch ihre Zugehörigkeit zu den Vollantigenen bzw. Haptenen bestimmt. Ausgehend von der Tatsache, daß als Hapten wirksame Verbindungen durch geeignete Zusätze zu Vollantigenen komplettiert werden können, wurden die Erythrocytenpräparate nach Zugabe von Aluminiumhydroxyd oder artfremden Protein in Form von Bakterieneiweiß, Pferdeserumglobulin oder Schweineserum als Immunisierungsmaterial verwendet. In Parallelversuchen wurde der Einfluß dieser verschiedenen Zusätze auf die antigene Wirksamkeit der spezifischen Substanzen geprüft. Dabei stellte sich heraus, daß die Erythrocytenfraktionen selbständig als Vollantigen wirksam waren. Eine Steigerung der Antikörperproduktion durch den Zusatz von Schweineserum konnte lediglich bei der acetonlöslichen Fraktion nachgewiesen werden. Entgegen den Untersuchungsbefunden mehrerer Autoren (2, 13, 42, 46), wonach die acetonlöslichen Bestandteile des Erythrocyten kein Lysinogen enthalten, konnte durch die Bildung haemolysierender Extraktantikörper bewiesen werden, daß auch diese Fraktion als Vollantigen zu bewerten ist.

Die Spezifitätsprüfung der Immunsere im Haemolysetest ergab, daß nicht alle

im Hemmungstest reagierenden Substanzen auch zur Ausbildung von Antikörpern führten (s. Tab. 35, 47, 57 und Tab. 59, Zeile 8 und 10). Diese Differenzen lassen sich damit erklären, daß einmal im Reagenzglasversuch neben Vollantigenen auch Haptene wirksam sind, die keine immunogene Fähigkeit besitzen und zum anderen, daß für die Möglichkeit der Antikörperproduktion sowohl in bezug auf die verschiedenen Faktorenantigene als auch hinsichtlich der individuellen Reaktionsbereitschaft der Versuchstiere erhebliche Unterschiede vorausgesetzt werden müssen. - Andererseits enthielten die Erythrocytenfraktionen jedoch auch Antigene, deren neutralisierender Anteil im Hemmungstest nicht nachgewiesen werden konnte (Tab. 59, Zeile 1 und 13). Die Ursache hierfür ist vermutlich in einem unzureichenden Antigen-Antikörper-Verhältnis zu sehen. Während die Antigenmenge nicht ausreichte, um die korrespondierenden Antikörper im Hemmungstest zu binden, führte die wiederholte Antigenverabreichung bei der Immunisierung zur Antikörperproduktion. Unter Berücksichtigung dieser Tatsachen erscheint der negative Ausfall des einen Tests weniger verläßlich, als das positive Ergebnis der anderen Untersuchungsmethode. - Ferner wurden von den Versuchstieren nicht nur Antikörper gebildet, die mit dem Ausgangserythrocyten spezifisch reagierten, sondern auch solche, deren korrespondierende Antigene am unbehandelten Erythrocyten nicht vorlagen. Tabelle 59 S. 64 a bringt eine Übersicht dieser Prüfungsergebnisse.

Aus der Tabelle 59 ist folgendes zu ersehen:

- 1.) Es gelang wiederholt von Kaninchen Monofaktorenseren gegen bestimmte Blutgruppenfaktoren zu gewinnen, deren korrespondierende Antigene an dem für die Herstellung des Immunisierungsmaterials verwandten Erythrocyten im Haemolysetest nachgewiesen wurden (Zeile 1, 3, 4, 5, 6 und 13).
 - a) der neutralisierende Anteil der spezifischen Substanzen in dem zur Immunisierung verwandten Erythrocytenpräparat wurde im Hemmungstest nachgewiesen (Zeile 3, 4, 5 und 6)
 - b) der neutralisierende Anteil der spezifischen Substanzen in dem zur Immunisierung verwandten Erythrocytenpräparat wurde im Hemmungstest nicht nachgewiesen (Zeile 1 und 13).
- 2.) Es gelang wiederholt von Kaninchen und Schafen Monofaktorenseren gegen bestimmte Blutgruppenfaktoren zu gewinnen, deren korrespondierende Antigene an dem für die Herstellung des Immunisierungsmaterials verwandten Erythrocyten im Haemolysetest nicht nachgewiesen wurden. In den zur Immunisierung verwandten Erythrocytenpräparaten wurde der neutralisierende Anteil der spezifischen Substanzen im Hemmungstest nachgewiesen (Zeile 2, 7, 8, 9, 10, 11, 12 und 13).

Tabelle 59

Zeile	Antigen- Isolierung	Im Ausgangsmaterial enthaltenes blutgruppenspezi- fisches Antigen	Nachweis des Antigens		Nachweis der korrespondierenden Antikörper in Immunseren von	
			am unbehand. Erythrocyten im Haemo- lysetest	im Erythro- cytenpräparat im Hemmungs- test	Kaninchen	Schafen
	Ver- fahren	Immu- nisi- erungs- material	System	Faktor		
1	Aceton- Präzipi- tation	Fraktion II (37)	AH	A ₁	+	entfällt
2	Petrol- äther-Ex- traktion	Fraktion I (29)			-	entfällt
3	Phenol- Methode	Dialysat (7,8,9)	C	X ₂	+	entfällt
4	Phenol- Methode	Dialysat (14)			+	entfällt
5	Petrol- äther-Ex- traktion	Fraktion I (36)			+	entfällt
6	Aceton- Präzipi- tation	Fraktion II (37)	F		+	entfällt
7	enzym. Dige- stion	Lösung (22,26)	V		+	entfällt
8	enzym. Dige- stion	Lösung (19)	FV		+	entfällt
	Petrol- äther-Ex- traktion	Fraktion I (19)	F		-	entfällt
	Petrol- äther-Ex- traktion	Fraktion I (19)	V		+	entfällt



Besonders deutlich wurden die im Vorhergehenden ausgeführten Befunde in einem Immunisierungsversuch mit dem Petrolätherextrakt eines im Haemolyse-test F-negativen Erythrocyten (Tab. 59, Zeile 13). Aus diesem Immunisierungsmaterial entstand sowohl ein spezifisches Anti-V-Serum, das den Ausgangserythrocyten und auch andere V-positive Blutkörperchen haemolysierte, als auch spezifische Anti-F-Seren, die mit dem Ausgangserythrocyten und auch anderen F-negativen Blutkörperchen keine Reaktion zeigten. - Im Gegensatz hierzu wurden aus den Extrakten im Haemolysetest F-positiver Erythrocyten nur spezifische Anti-F-Seren gewonnen. Ähnliche Verhältnisse fand Witebsky (52) in seinen Versuchen mit Erythrocytenextrakten der menschlichen A- und B-Gruppen. Die aus den Extrakten menschlicher A-Erythrocyten hergestellten Immunsereen des Kaninchens zeigten mit den Blutkörperchen dieser Gruppe spezifische Reaktionen, dagegen konnten die Antikörper der B-Extraktseren die korrespondierenden Erythrocyten weder agglutinieren noch haemolysieren. Die Bildung spezifischer F-Antikörper erfolgte nach der Immunisierung mit verschiedenen Erythrocytenpräparaten F-negativer Blutkörperchen (s. Tab. 59, Zeile 8 bis 13). Im Haemolysetest und durch den Absorptionsversuch stellte sich heraus, daß diese Antikörper gegenüber den Erythrocyten homozygot F/F veranlagter Individuen besonders reaktiv waren. Die Erythrocyten heterozygot F/V veranlagter Individuen wurden dagegen gar nicht oder von hochtitrigen Seren nur in den unteren Verdünnungsstufen haemolysiert. Nach Berichten von Stormont (45) ist die serologische Differenzierung des Genotyps im FV-System auf Grund quantitativer Reaktionsunterschiede im Haemolysetest möglich.

Die Seren aus der Präzipitatfraktion eines Erythrocyten enthielten zwei verschiedene Blutgruppenfaktoren, die erst im Absorptionsversuch getrennt wurden. Reine Monofaktorensereen wurden dagegen ohne Ausnahme aus den Dialysaten, Fermentationslösungen, Petroläther- und Acetonextrakten gebildet. Damit war bewiesen, daß die Trennung der blutgruppenspezifischen Substanzen vom arteigenen Eiweiß des Rindes gelungen war. Die in der Heteroimmunisierung störenden Proteinantigene waren in den Erythrocytenpräparaten wirkungslos.

V. ZUSAMMENFASSUNG

- 1.) Die Isolierung blutgruppenspezifischer Antigene vom Erythrocyten des Rindes gelang durch die Behandlung mit Phenol, die enzymatische Digestion und die Extraktion mit den organischen Lösungsmitteln Petroläther und Aceton. Die Prüfung des isolierten Materials auf den Gehalt an spezifischen Substanzen erfolgte im Hemmungstest durch die Neutralisierung bekannter Antikörper und im Tierversuch durch die Produktion spezifischer Antiseren.
- 2.) Nach der Phenolmethode konnten unter Berücksichtigung einer mehrtägigen Einwirkungsdauer des Phenols im sauren bis neutralen Bereich aus Erythrocytenstroma blutgruppenspezifische Substanzen gewonnen werden, die beim immunisierten Kaninchen zur Ausbildung reiner Monofaktorensereen führten. Zusätze von artfremdem Eiweiß oder Aluminiumhydroxyd hatten keinen Einfluß auf die antigene Wirksamkeit des Immunisierungsmaterials.
- 3.) In den durch die Fermentbehandlung gewonnenen Lösungen wurden im Vergleich zu den Phenoldialysaten in bezug auf die Zahl der erfaßten Faktoren und die Menge der neutralisierenden Substanzen im Hemmungstest eine Verbesserung der Resultate erreicht. Die wiederholte Fermentzugabe während der Verarbeitung des Ausgangsmaterials hatte keinen Einfluß auf die Isolierung blutgruppenspezifischer Substanzen. Im Tierversuch entsprachen die Ergebnisse den Immunisierungsversuchen aus der Phenolreihe. Die Produktion eines Immunantisera, das mit dem Ausgangserythrocyten keine Reaktion zeigte, wurde als Beweis für die Tatsache gewertet, daß im Erythrocyten auch solche blutgruppenspezifischen Antigene vorliegen, die an seiner Oberfläche im Haemolysetest nicht reaktionsfähig sind.
- 4.) In dem kombinierten Extraktions- und Digestionsverfahren (Aufschluß mit Petroläther, Pepsin und Aceton) wurde das Erythrocytenstroma in mehrere Fraktionen aufgespalten, in welchen blutgruppenspezifische Substanzen sowohl im Hemmungstest als auch im Tierversuch nachgewiesen werden konnten. Hierbei stellte sich heraus, daß der Hemmungstest nicht in allen Fällen die Anwesenheit antigener Substanzen anzeigt. Wie in der Fermentbehandlung gelang auch nach diesem Verfahren die Isolierung blutgruppenspezifischer Antigene, die an der Erythrocytenoberfläche nicht reaktionsfähig waren. Die vom Versuchstier gebildeten Antikörper zeigten mit dem zur Herstellung des Immunisierungsmaterials verwendeten Erythrocyten keine Reaktion.

- 5.) Die Prüfung der Immunseren im Flockungstest ergab je nach Herstellungsgang des Immunisierungsmaterials einen unterschiedlichen Gehalt an Lipoidantikörpern. Eindeutige Reaktionsdifferenzen wurden bei Immunseren, deren Lysin sich als identisch erwiesen hatte, festgestellt. Beziehungen zwischen lipoid- und blutgruppenspezifischen Antikörpern konnten nicht nachgewiesen werden.

VI. LITERATURVERZEICHNIS

- 1.) Avery, O.T. und W.F. Goebel: Chemo-immunologische Studien über konjugierte Kohlehydrat-Proteine.
J. Exper. Med., New York, 54 (1931)
- 2.) Bang, F. B. und J. Forssmann: Untersuchungen über die Haemolysinbildung.
Beitr. chem. Phys. Path., Braunschweig,
8 (1906), 238-270
- 3.) Brahn, B. und F. Schiff: Über die komplexe Natur der Blutgruppen-
substanz A des Menschen.
Klin. Wschr. 5 (1926) 1455 f.
- 4.) Brahn, B., F. Schiff und
F. Weimann: Über die chemische Natur der Gruppen-
substanz A des Menschen.
Klin. Wschr. 11 (1932) 1592
- 5.) Benett, C. B. und
C. L. A. Schmidt: On Red Cell Globulin.
J. Immunol., Baltimore, 4 (1919) 29 - 33
- 6.) Calvin, M., E. S. Evans,
V. Behrend u. G. Calvin: Rh Antigen and Hapten. Nature of Antigen
and its Isolation from Erythrocyte Stroma.
Soc. Exper. Biol. Proc. 60/61 (1945/46) 416
- 7.) Dautwitz, F. und K. Landsteiner: Über die Beziehungen der Lipoide zur
Serumhaemolyse.
Beitr. chem. Phys. Path., Braunschweig,
9 (1907) 431
- 8.) Doerr, R. und C. Hallauer: Über die Antigenfunktion des Forssmann-
schen Lipoids und anderer lipoider Haptene.
Ztschr. Immunit. frsch., Jena, 45 (1926)
170 - 190
- 9.) Doerr, R. und C. Hallauer: Über die Antigenfunktion des Forssmann-
schen Lipoids und anderer lipoider Haptene.
II. Mitteilung. Ztschr. Immunit. frsch., Jena,
47 (1926) 291
- 10.) Dölter, W.: Untersuchungen über die gruppenspezifischen
Rezeptoren des Menschenblutes und ihre
Antikörper. Ztschr. Immunit. frsch., Jena,
43 (1925) 95 - 127

- 11.) Dold, H. und R. Rosenberg: Nachweis von Isopräzipitinen im menschlichen Blut. Nachweis der vier menschlichen Blutgruppen durch Isopräzipitation.
Klin. Wschr. 7 (1928), 1
- 12.) Dujarric de la Rivière und A. Eyquem: Les Groupes Sanguis Chez Les Animaux.
Ed. Flammarion, Paris, 1953
- 13.) Eisler, M. und P. Moritsch: Blood-Group Specific Reactions in Human Blood.
Zschr. Immunit. frsch., Jena, 57 (1928), 421 - 454
- 14.) Ford, W. W. und J. T. Halsey: Contributions to the Study of Haemagglutinins and Haemolysins.
J. Med. Res., Boston, 11 (1904), 403
- 15.) Greenfield, G.: Experimentelle Untersuchungen über gruppen-spezifische Antigene und Antikörper.
Zschr. Immunit. frsch., Jena, 56 (1928)
- 16.) Hallauer, C.: Zur Frage der Isolierung gruppenspezifischer Antigene menschlicher Erythrocyten.
Zschr. Immunit. frsch., Jena, 76 (1932)
- 17.) Hallauer, C.: Weitere Versuche zur Isolierung wasserlöslicher Gruppenstoffe aus menschlichen Erythrocyten.
Zschr. Immunit. frsch., Jena, 83 (1934)
- 18.) Howe, C.: The Influenza Virus Receptor and Blood Group Antigen of Human Erythrocyte Stroma.
J. Immunol., Baltimore, 66 (1951), 32
- 19.) Irwin, M. R. und A. Golden: Individual Response In Rabbits to Immunization with a Complex Antigen.
J. Infect. Dis., Chicago, 70 (1942), 119 - 125
- 20.) Jorpes, E.: The Protein Component of the Erythrocyte Membrane or Stroma.
Biochem. J., Cambridge, 36 (1932), 1488 - 1502
- 21.) Jorpes, E. und G. Norlin: Über die chemische Natur der Blutgruppenmerkmale.
Zschr. Immunit. frsch., Jena, 81 (1933)-1934), 152-162

- 22.) Kabat, E. A.:
Blood Group Substances. Their Chemistry
and Immunochemistry.
New York, Acad. Press (1956)
- 23.) Kossjakow, P. N.:
Polysaccharide - Träger der Gruppeneigen-
schaften des Menschen.
Zschr. Immunit. frsch., Jena, 99 (1941),
221 - 231
- 24.) Landsteiner, K. und
J. v. d. Scheer:
On the Antigens of Red Blood Corpuscles.
The Question of Lipoid Antigens.
J. Exper. Med., New York, 41 (1925),
427
- 25.) Landsteiner, K. und
J. v. d. Scheer:
On the Antigens of Red Blood Corpuscles.
II. Flocculation Reactions with Alcoholic
Extracts of Erythrocytes.
J. Exper. Med., New York, 42 (1925),
123 - 143
- 26.) Landsteiner, K. und
J. v. d. Scheer:
Über die Spezifität serologischer Reaktionen
einfacher chemischer Verbindungen.
J. Exper. Med., New York, 54 (1931), 295
- 27.) Landsteiner, K. und
M. W. Chase:
On Group Specific Substances.
III The Substance in Commercial Pepsin.
J. Exper. Med., New York, 63 (1936), 813
- 28.) Landsteiner, K. und
M. v. Eisler:
Über die Wirkungsweise haemolytischer
Sera.
Wien. klin. Wschr., Wien, 24 (1904), 676
- 29.) Landsteiner, K. und
A. Simms:
Production of Heterogenetic Antibodies
with Mixtures of the Binding Part of the
Antigen and Protein.
J. Exper. Med., New York, 38 (1923), 127
- 30.) Landsteiner, K.:
The Specificity of Serological Reactions.
Cambridge, Massachusetts, Havard Univer-
sity Press (1947)
- 31.) Misawa, T.:
Beiträge zur Kenntnis von der Natur der
Normalhaemolysine.
Jap. J. Med. Sc. 7, Soc. Med. 1 (1932), 105 -
107

- 32.) Mitscherlich, E. und
B. Liess: Die serologische Differenzierung von
Vibrio fetus-Stämmen.
Dtsch. tierärztl. Wschr., Hannover, 65
(1958), 2 - 5
- 33.) Morgan, W. T. J.: An Artificial Antigen with Blood Group A
Specificity.
Society of chem. Industry, 60 (1941)
- 34.) Morgan, W. T. J.: The Chemical Basis of Blood Group Spec-
ificity in Man.
Naturwissenschaftl. Rundschau. 8 (1958), 290
- 35.) Morgan, W. T. J. und
S. M. Partridge: Studies in Immunochemistry. VI. The Use
of Phenol and of Alkali in the Degradation
of Antigenic Material Isolated from Bacteria
Dysenteriae (Shiga).
Biochem. J., London, 35 (1941), 1140 - 1163
- 36.) Plaut, F. und
H. Rudy: Über die Immunisierungen mit adsorbierten
Haptenen insbesondere mit Hirnhaptenen
ohne artfremdes Eiweiß.
Zschr. Immunit. frsch., Jena, 81 (1933/34),
87 - 100
- 37.) Prankerdt, T. A. J.,
K. I. Altman und
J. R. Anderson: Electrophoresis of Human Red-Cell
Stroma.
Nature, 174 (1954), 1146
- 38.) Royal, G. C., L. C. Ferguson
und T. S. Sutton: Die Isolierung von Blutgruppenspezifischen
Substanzen von Erythrocyten.
J. Immunol., Baltimore, 71 (1953), 22
- 39.) Sachs, H.: Antigenstruktur und Immunisierungsvermö-
gen.
Zbl. Bakter. 104 (1927), 128
- 40.) Schiff, F. und
L. Adelsberger: Über die blutgruppenspezifischen Antikörper
und Antigene.
Zschr. Immunit. frsch., Jena, 40 (1924),
335 - 367
- 41.) Schiff, F. und
G. Weiler: Blood Groups and Enzymes of Human
Organism.
Biochem. Zschr., Berlin, 235 (1931), 454-465

- 42.) Schmidt, H.:
Die Beziehungen des lipoidartigen
Haemolysinogens von Bang und Forssmann
zu den heterogenitischen Hammelblut-
haemolysinen.
Zschr. Immunit. frsch., Jena, 33 (1922),
216 - 232
- 43.) Schmidt, C.L.A. und
D.E. Dement:
The Antigenic Properties of Red Cell
Globulin.
Soc. Exper. Biol. Proc., 19 (1921/22), 345
- 44.) Schütz, Fr. und
E. Wöhlisch:
Bedeutung und Wesen von Haemagglutination
und Blutgruppenbildung beim Menschen.
Klin. Wschr. 36 (1924), 1614
- 45.) Stormont, C.:
The F-V and Z-System of Bovine Blood
Groups.
Genetics 37 (1952), 39 - 48
- 46.) Takaki, K.:
Zur Kenntnis des Lysinogens der Blut-
scheiben.
Beitr. chem. Phys. Path., Braunschweig, 11
(1908), 274 - 287
- 47.) Torikata, R. und
K. Fujimori:
Mikrobiotische spezifische Präzipitation
und Komplementbindungsreaktion als Argu-
mente für die Verbindung mit dem homo-
logen Antikörper besonders unter Berücksichtigung des gekochten Antigens.
Zschr. Immunit. frsch., Jena, 56 (1928), 155
- 48.) Westphal, O., Lüderitz, O.
und F. Biester:
Über die Extraktion von Bakterien mit
Phenol/Wasser.
Zschr. Naturfrsch., Tübingen, 7 (1952)
148 - 155
- 49.) Westphal, O. und
E. Reiche:
Aufbau eines künstlichen Vollantigens der
menschlichen Blutgruppe A.
Die Naturwissenschaften. Springer-Verlag
Berlin W 9, Heft 1/4 (1944), 40
- 50.) Witebsky, E.:
Über die Antigenfunktion der alkohollöslichen
Bestandteile menschlicher Blutkörperchen
verschiedener Gruppen.
Zschr. Immunit. frsch., Jena, 48 (1926), 369

- 51.) Witebsky, E.:
Über die Antigenfunktion der alkohollöslichen Bestandteile menschlicher Blutkörperchen verschiedener Gruppen.
II. Mitteilung: Eine neue heterogenetische Rezeptorengemeinschaft.
Zschr. Immunit. frsch., Jena, 49 (1926),
1 - 17
- 52.) Witebsky, E. und
K. Okabe:
Isoagglutinine und gruppenspezifische Lipoide.
Zschr. Immunit. frsch., Jena, 54 (1927/28),
131
- 53.) Zozaya, J.:
Die Herstellung von Antigenen mit Hilfe einer Kombination bakterieller Polysaccharide und Kollodium.
Science, 74 (1931), 1915

Am Schluß meiner Arbeit empfinde ich es als angenehme Pflicht, Herrn Professor Dr. E. Mitscherlich sowohl für die Überlassung des Themas als auch für den jederzeit gewährten Rat, meinen Dank auszudrücken.

VII. A N H A N G

Tabellen

Tabelle 27

Versuchs- gruppe	Immunsierungs- material	Versuchstier Nr.	Prüfung der Seren auf Immunitätkörper 20 Tage nach der letzten Injektion	Titel
I	Lösung Nr. 29	33	spezifische Antikörper gegen den Faktor F	1 : 64
		34	"	1 : 16
		35	"	1 : 8
		36	"	1 : 8
II	Erythrocyten- Suspension von 132	37	spezifische Antikörper gegen den Faktor V (nach Absorption mit F/F-Erythrocyten)	1 : 512
		38	keine spezifischen hämolysierenden Antikörper	1 : 1024

Tab. 27: Ergebnis des 4. Immunsierungsversuches.

Tabelle 28

Lösung	Antiseren										Kontrolle 5					Kontroll. 1			Kontroll. 2			Kontroll. 3		
Titel	O ₃	Y ₂	D ¹	E ¹	G ₃	W	V	J ₁	J ₂	Z	R _d A ₁	K _{an} A ₁	X ₂	F _{Rd}	F _{Kan}	F _{Ph}	F ₁₄₉	F ₅₂₈	S	U ₂	NaCl/Brv.	Kpl.	Leg.	
unverd.	5	5	5	5	5	5	0	5	5	5	5	5	5	0	0	5	5	5	5	5	-	-	-	
1/2	5	5	5	5	5	5	0	5	5	5	3	3	4	0	0	5	5	5	5	5	-	-	-	
1/4	5	5	3	0	3	5	0	5	5	5	0	0	5	0	0	5	5	5	5	5	-	-	-	
1/8	3	3	0	0	0	2	0	3	3	3	0	4	0	0	0	4	3	2	2	0	-	-	-	
1/16	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	-	-		
Kontroll.	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	-	-	-	

Tab. 28: Hemmungstest der durch Petroläther-Extraktion gewonnenen Emulsion aus Stroma I des Erythrocyten 132 (Nr. 29 a).
Das Reaktionsergebnis des Hemmungstests ist in Einheiten der Hemmungseigenschaft, das des Hämolysstests in
Stärken des Hämolysgrades angegeben.

Hemmungstest mit der durch Petroläther-Extraktion gewonnenen Emulsion aus Stroma I des Erythrocyten 132 (Nr. 29 b). - Zahlenerklärung siehe Tabelle 28.

Tabelle 30

Hemmungstest mit der durch Aceton-Präzipitation gewonnenen Suspension Nr. 30 a aus Stroma I des Erythrocyten 132. - Das Reaktionsergebnis des Hemmungstests ist in Einheiten der Hemmungseigenschaft, das des Haemolysestests in Stärken des Haemolysegrades angegeben.

Tabelle 31

Lösung	Antiseren										Kontrolle 5					Kontr.		Kontr.				
Titer	O ₃	Y ₂	D ₁	E ₁	C ₂	W	V	J ₁	J ₂	Z	Rd _{A₁}	Kan _{A₁}	Rd _{Kan}	Kan _{Kan}	P _{Ph}	F ₁₄₉	F ₅₂₈	S	U ₂	X ₂	NacI/Erz. Kpl.	Lsg.
unverd.	0	0	0	0	0	5	5	5	5	5	0	5	0	0	5	5	5	0	0	0	-	-
1/2	0	0	0	0	0	3	4	5	5	5	3	0	0	0	5	5	5	0	0	0	-	-
1/4	0	0	0	0	0	0	0	5	5	0	0	0	0	0	5	5	5	0	0	0	-	-
1/8	0	0	0	0	0	0	0	3	2	0	0	0	0	0	3	5	5	0	0	0	-	-
1/16	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4	0	0	0	0	-	-
Kontr.	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	-	-

Tab. 31: Hemmungstest mit der durch Aceton-Präzipitation gewonnenen Suspension Nr. 30 b aus Stroma I des Erythrocyten 132. - Das Reaktionsergebnis des Hemmungstests ist in Einheiten der Hemmungseigenschaft, das des Haemolysetests in Stärken des Haemolysegrades angegeben.

Tabelle 32

Lösung	Antiseren										Kontrolle 5					Kontr. Kontr. Kontr.					
Titer	O ₃	Y ₂	D ₁	E ₁	C ₂	W	V	J ₁	J ₂	Z	Rd	Kan	Rd	Kan	P ₁₄₉	S	U ₂	X ₂	NacI/Erz. Kpl.	Leg.	
unverd.	5	5	5	0	5	5	0	0	0	5	0	5	0	5	5	5	5	5	0	-	-
1/2	5	5	4	0	3	5	0	0	0	4	0	3	0	0	5	5	5	3	0	-	-
1/4	0	5	2	0	3	5	0	0	0	2	0	0	0	0	5	5	3	5	2	-	-
1/8	0	3	0	0	0	2	0	0	0	2	0	0	0	0	3	4	0	0	0	-	-
1/16	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	-
Kontr.	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	-	-

Tab. 32: Hemmungstest mit der durch Aceton-Extraktion gewonnenen Emulsion Nr. 31 a aus Stroma I des Erythrocyten 132. - Das Reaktionsergebnis des Hemmungstests ist in Einheiten der Hemmungseigenschaft, das des Haemolysetests in Stärken des Haemolysegrades angegeben.

Tabelle 33

Lösung	Antiseren										Kontrolle 5				Kontr.1 Kontr.2 Kontr.3											
	O ₃		Y ₂	D'	E'	C ₂	W	V	J ₁	J ₂	Z	A ₁	Rd	Kan	F _{Rd}	F _{Kan}	F _{Ph}	F ₁₄₉	F ₅₂₈	S	U ₂	X ₂	NaCl/Ery.	Kpl.	Lsg.	
unverd.	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5	0	0	0	0	0	-	-	-
1/2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5	0	0	0	0	0	-	-	-
1/4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5	0	0	0	0	0	-	-	-
1/8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	0	0	0	0	0	-	-	-
1/16	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	-	-
Kontr.	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4

Tab. 33: Hemmungstest mit der durch Aceton-Extraktion gewonnenen Emulsion Nr. 31 b aus Stroma I des Erythrocyten 132. - Das Reaktionsergebnis des Hemmungstests ist in Einheiten der Hemmungseigenschaft, das des Haemolysestest in Stärken des Haemolysegrades angegeben.

Tabelle 34

Schweine- serum	Antiseren														Kontr.1 Kontr.2 Kontr.3									
	O ₃	Y ₂	D'	E'	C ₂	W	V	J ₁	J ₂	Z	Rd A ₁	Kan A ₁	F _{Rd}	F _{Kan}	F _{Ph}	F ₁₄₉	F ₅₂₈	S	U ₂	X ₂	NaCl/Ery.	Kpl.	Lsg.	
1/3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	-	-
1/6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	-	-
Kontr.	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4

Tab. 34: Hemmungstest mit dem Schweineserum das den Fraktionen des Erythrocyten 132 zugesetzt wurde. - Das Reaktionsergebnis des Hemmungstests ist in Einheiten der Hemmungseigenschaft, das des Haemolyse-
tests in Stärken des Haemolysegrades angegeben.

Tabelle 37

Lösung		Antiseren														Kontrolle 5					Kontrollen			
Titer	A ₁	A ₂	Y ₂	C ₂	W	X ₂	V	P'	J ₁	J ₂	E' ₁	E' ₃	P Rd	P ^{Kan}	P ^{Ph}	P ¹⁴⁹	P ⁵²⁸	L	S	Z	NaCl/Ery.	Kont. 1	Kont. 2	Kont. 3
unverd.	0	0	5	0	5	0	0	0	9	5	5	0	0	0	5	5	5	0	0	0	-	-	-	
1/2	0	0	5	0	5	0	0	0	5	5	3	0	0	0	5	5	5	0	0	0	-	-	-	
1/4	0	0	3	0	2	0	0	0	5	5	0	0	0	0	5	5	5	0	0	0	-	-	-	
1/8	0	0	0	0	0	0	0	0	3	2	0	0	0	0	3	3	2	0	0	0	-	-	-	
1/16	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	-	-	
Kont.	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	-	-	-	

Tab. 37: Hemmungstest mit der durch Petroläther-Extraktion gewonnenen Emulsion Nr. 32 a aus Strom I des Erythrocyten 369. - Das Reaktionsergebnis des Hemmungstests ist in Einheiten der Hemmungseigenschaft, das des Haemolyse-tests in Stärken des Haemolysegrades angegeben.

Tabelle 38

Lösung	Antiseren																			Kontrolle 5					Kont. 1			Kont. 2		Kont. 3	
Titer	A ₁	A ₂	Y ₂	C ₂	W	X ₂	V	P ¹	J ₁	J ₂	E ¹	E ³	P Rd	P ^{Kan}	P ^{Ph}	P ¹⁴⁹	P ⁵²⁸	L	S	Z	NaCl/Dry.	Kpl.	Leg.								
unverd.	0	0	0	0	0	0	0	0	5	5	0	0	0	0	5	5	5	0	0	0	-	-	-								
1/2	0	0	0	0	0	0	0	0	5	5	0	0	0	0	5	5	5	0	0	0	-	-	-								
1/4	0	0	0	0	0	0	0	0	5	2	0	0	0	0	5	5	5	0	0	0	-	-	-								
1/8	0	0	0	0	0	0	0	0	3	0	0	0	0	0	3	4	2	0	0	0	-	-	-								
1/16	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	-	-								
Kont. 4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	-	-	-								

Tab. 38: Hemmungstest mit der durch Petroläther-Extraktion gewonnenen Emulsion Nr. 32 b aus Strom I des Erythrocyten 369. - Das Reaktionsergebnis des Hemmungstests ist in Einheiten der Hemmungseigenschaft, das des Haemolyse-tests in Stärken des Haemolysegrades angegeben.

Tabelle 39

Lösung	Antiseren										Kontrolle 5			Kontroll. 1			Kontroll. 2			Kontroll. 3		
Titer	A ₁	A ₂	Y ₂	C ₂	W	X ₂	V	P'	J ₁	J ₂	E'	E'	E'	F ^{kan}	F ^{Ph}	F ⁵²⁸	L	S	Z	Kpl.	Kpl.	Lsg.
unverd.	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5	5	0	0	0	-	-	-
1/2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5	5	0	0	0	-	-	-
1/4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5	5	0	0	0	-	-	-
1/8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5	5	0	0	0	-	-	-
1/16	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	3	4	0	0	0	0	0
Kontroll.	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4

Tab. 39: Hemmungstest mit der durch Aceton-Präzipitation gewonnenen Suspension Nr. 33 a des Erythrocyten 369. - Das Reaktionsergebnis des Hemmungstests ist in Einheiten der Hemmungseigenschaft, das des Haemolysetests in Stärken des Haemolysegrades angegeben.

Tabelle 40

Lösung	Antiseren										Kontrolle 5			Kontroll. 1			Kontroll. 2			Kontroll. 3		
Titer	A ₁	A ₂	Y ₂	C ₂	W	X ₂	V	P'	J ₁	J ₂	E'	E'	E'	F ^{kan}	F ^{Ph}	F ⁵²⁸	L	S	Z	Kpl.	Kpl.	Lsg.
unverd.	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5	5	0	0	0	-	-	-
1/2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5	5	0	0	0	-	-	-
1/4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5	5	0	0	0	-	-	-
1/8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	4	0	0	0	0	0	0
1/16	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Kontroll.	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4

Tab. 40: Hemmungstest mit der durch Aceton-Präzipitation gewonnenen Suspension Nr. 33 b des Erythrocyten 369. - Das Reaktionsergebnis des Hemmungstests ist in Einheiten der Hemmungseigenschaft, das des Haemolysetests in Stärken des Haemolysegrades angegeben.

Tabelle 41

Lösung		Antiseren														Kontrolle 5					Kontr. 1 Kontr. 2 Kontr. 3		
Titer	A ₁	A ₂	Y ₂	C ₂	W	X ₂	V	P'	J ₁	J ₂	E' ₁	E' ₂	P _{Rd}	P _{Kan}	P _{Ph}	P ₁₄₉	P ₅₂₈	S	L	Z	NaCl/Ery.	Kpl.	Leg.
unverd.	0	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5	5	5	0	0	0	-	-	-
1/2	0	0	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5	5	5	0	0	0			
1/4	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5	5	5	0	0	0			
1/8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	4	2	0	0	0			
1/16	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0			
Kontr.	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4			

Tab. 41: Hemmungstest mit der durch Aceton-Extraktion gewonnenen Emulsion Nr. 34 a aus Stroma I des Erythrocyten 369. - Das Reaktionsergebnis des Hemmungstests ist in Einheiten der Hemmungseigenschaft, das des Hämolysetestes in Stärken des Hämolysegrades angegeben.

Tabelle 42

Lösung		Antiseren										Kontrolle 5					Kontr. 1			Kontr. 2			Kontr. 3		
Titer	A ₁	A ₂	Y ₂	C ₂	W	X ₂	V	P'	J ₁	J ₂	E' ₁	E' ₂	P _{Rd}	P _{Kan}	P _{Ph}	P ₁₄₉	P ₅₂₈	S	L	Z	NaCl/Ery.	Kpl.	Leg.		
unverd.	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5	5	0	0	0	0	-	-	-		
1/2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5	0	0	0	0	0					
1/4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	5	0	0	0	0					
1/8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	0	0	0	0	0					
1/16	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0					
Kontr.	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4					

Tab. 42: Hemmungstest mit der durch Aceton-Extraktion gewonnenen Emulsion Nr. 34 b aus Stroma I des Erythrocyten 369. - Das Reaktionsergebnis des Hemmungstests ist in Einheiten der Hemmungseigenschaft, das des Hämolysetestes in Stärken des Hämolysegrades angegeben.

Tabelle 43

Lösung	Antiseren										Kontrolle 5					Kontr.1			Kontr.2			Kontr.3		
Titer	A ₁	A ₂	Y ₂	C ₂	W	X ₂	V	P ₁	J ₁	J ₂	E ₁	E ₁ ₃	E ₁ Rd	F _{Kan}	F _{Ph}	F ₁₄₉	F ₅₂₈	S	L	Z	NaCl/Ery.	Kpl.	Lsg.	
unverd.	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5	5	0	0	0	0	-	-	-
1/2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5	5	0	0	0	0	0	-	-	-
1/4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	5	0	0	0	0	0	-	-	-
1/8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	0	0	0	0	0	-	-	-
1/16	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	-	-
Kontr.	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	-	-	-

Tab. 43: Hemmungstest mit Lösung Nr. 35 a aus Stroma I des Erythrocyten 369. - Das Reaktionsergebnis des Hemmungstests ist in Einheiten der Hemmungseigenschaft, das des Haemolysestests in Stärken des Haemolysegrades angegeben.

Tabelle 44

Lösung	Antiseren										Kontrolle 5					Kontr.1			Kontr.2			Kontr.3	Lsg.
	Titer	A ₁	A ₂	Y ₂	C ₂	W	X ₂	V	P ₁	J ₁	J ₂	E ₁	E ₁	E ₁	F _{Rd}	F _{Kan}	F ^{Ph}	F ¹⁴⁹	F ⁵²⁸	S	L	Z	Kpl.
unverd.		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5	0	0	0	-	-
1/2		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5	0	0	0	-	-
1/4		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	0	0	0	-	-
1/8		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	-
Kontr.	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	-	-

Tab. 44: Hemmungstest mit Lösung Nr. 35 b aus Stroma I des Erythrocyten 369. - Zahlenerklärung siehe Tabelle 43.

Tabelle 45

Schweine- serum Titer	Antiseren																			Kontrollen				
	A ₁	A ₂	Y ₂	C ₂	W	X ₂	V	P ¹	J ₁	J ₂	E ¹	E ¹	F Rd	F ^{Kan}	F ^{Ph}	F ¹⁴⁹	F ⁵²⁸	S	L	Z	NaCl/Ery.	Kpl.	IsG.	
1/3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	-	-
1/6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Kontrollen	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4

Tab. 45: Hemmungstest mit dem Schweineserum das den Fraktionen des Erythrocyten 369 zugesetzt wurde. - Das Reaktionsergebnis des Hemmungstests ist in Einheiten der Hemmungseigenschaft, das des Haemolysestests in Stärken des Haemolysegrades angegeben.

Tabelle 48

Lösung	Antiseren										Kontrolle 5					Kontr. 1		Kontr. 2		Kontr. 3	
Titer	A	Y ₂	E ₃	R _d	K _{an}	P _h	P ₁₄₉	F ₅₂₈	U ₂	I	C ₂	X ₂	V	J ₁	J ₂	L	S	Z	NaCl/Ery.	Kpl.	Lsg.
unverd.	0	0	5	0	0	5	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	-	-
1/2	0	0	2	0	0	3	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	-	-
1/4	0	0	0	0	0	0	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	-	-
1/8	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	-	-
1/16	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	-	-
Kontr.	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4

Tab. 48: Hemmungstest mit der durch Petroläther-Extraktion gewonnenen Emulsion Nr. 36 a des Erythrocyten 243. - Das Reaktionsergebnis des Hemmungstests ist in Einheiten der Hemmungseigenschaft, das des Haemolyse-tests in Stärken des Haemolysegrades angegeben.

Tabelle 49

Lösung	Antiseren							Kontrolle 5							Kontr. 1		Kontr. 2		Kontr. 3		
Titer	A	Y ₂	E' ₃	F ₃ Rd	F ₃ Kan	F ₃ Ph	F ₃ 149	F ₃ 528	U ₂	I	C ₂	X ₂	V	J ₁	J ₂	L	S	Z	NaCl/Ery.	Kpl.	Lsg.
unverd.	0	0	0	0	0	0	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	-	-
1/2	0	0	0	0	0	0	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	-	-
1/4	0	0	0	0	0	0	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	-	-
1/8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	-	-
Kontr.	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4

Tab. 49: Hemmungstest mit der durch Petroläther-Extraktion gewonnenen Emulsion Nr. 36 b aus Stroma I des Erythrocyten 243. - Das Reaktionsergebnis des Hemmungstests ist in Einheiten der Hemmungseigenschaft, das des Haemolyse-tests in Stärken des Haemolysegrades angegeben.

Tabelle 50

Lösung rter	Antiseren										Kontrolle 5					Kont. 1			Kont. 2			Kont. 3		
	A	Y	E ₁	₃	Rd	F _{Kan}	F _{Ph}	F ₁₄₉	F ₅₂₈	U ₂	I	C ₂	X ₂	V	J ₁	J ₂	L	S	Z	NaCl/Ery.	Kpl.	Lsg.		
unverd.	0	0	5	0	0	5	5	5	5	0	0	0	0	0	5	5	0	0	0	-	-	-		
1/2	0	0	2	0	0	2	5	5	5	0	0	0	0	0	2	3	0	0	0					
1/4	0	0	0	0	0	0	5	5	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0					
1/8	0	0	0	0	0	0	2	3	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0					
1/16	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0					
Kont.	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4					

Tab. 50: Hemmungstest mit der durch Aceton-Präzipitation gewonnenen Suspension Nr. 37 a aus Stroma I des Erythrocyten 243. - Das Reaktionsergebnis des Hemmungstests ist in Einheiten der Hemmungseigenschaft, das des Hemolysetests in Stärken des Hemolysegrades angegeben.

Tabelle 51

Lösung	Antiseren										Kontrolle 5					Kont. 1	Kont. 2	Kont. 3			
Titler	A	X ₂	E' ₃	F Rd	F ^{Kan}	F ^{Ph}	F ¹⁴⁹	F ⁵²⁸	U ₂	I	C ₂	X ₂	V	J ₁	J ₂	L	S	Z	NaCl/Ery.	Kpl.	Lsg.
unverd.	0	0	0	0	0	5	5	5	0	0	0	0	0	5	5	0	0	0	-	-	-
1/2	0	0	0	0	0	5	5	5	0	0	0	0	0	2	3	0	0	0			
1/4	0	0	0	0	0	5	5	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0			
1/8	0	0	0	0	0	2	3	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0			
1/16	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0			
Kont.	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4			

Tab. 51: Hemmungstest mit der durch Aceton-Präzipitation gewonnenen Suspension Nr. 37 b aus Stroma I des Erythrocyten 243. - Das Reaktionsergebnis des Hemmungstests ist in Einheiten der Hemmungseigenschaft, das des Hemolysetests in Stärken des Hemolysegrades angegeben.

Tabelle 52

Lösung	Antiseren										Kontrolle 5										Kontr. 1		Kontr. 2		Kontr. 3	
	A	Y ₂	E'	E'	F ₃	F _{Rd}	F _{Kan}	F _{Ph}	F ₁₄₉	F ₅₂₈	U ₂	I	C ₂	X ₂	V	J ₁	J ₂	L	S	Z	NaCl/Ery.	Kpl.	Kontr. 1	Kontr. 2	Kontr. 3	Leg.
unverd.	5	5	5	5	0	5	5	5	5	5	0	5	0	0	0	0	0	5	5	5	-	-	-	-	-	-
1/2	2	5	5	5	0	2	2	5	2	0	0	3	0	0	0	0	0	2	2	2	-	-	-	-	-	-
1/4	0	2	4	0	0	0	0	5	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	-	-	-	-	-	-
1/8	0	0	2	0	0	0	0	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	-	-	-	-	-
1/16	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	-	-	-	-	-
Kontr. 4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	-	-	-	-	-	-

Tab. 52: Hemmungstest mit der durch Aceton-Extraktion gewonnenen Emulsion Nr. 38 a aus Stroma I des Erythrocyten 243. - Das Reaktionsergebnis des Hemmungstests ist in Einheiten der Hemmungseigenschaft, das des Haemolysatests in Stärken des Haemolysgrades angegeben.

Tabelle 53

Lösung	Antiseren										Kontrolle 5										Kontr. 1		Kontr. 2		Kontr. 3	
	A	Y ₂	E'	E'	F ₃	F _{Rd}	F _{Kan}	F _{Ph}	F ₁₄₉	F ₅₂₈	U ₂	I	C ₂	X ₂	V	J ₁	J ₂	L	S	Z	NaCl/Ery.	Kpl.	Kontr. 1	Kontr. 2	Kontr. 3	Leg.
unverd.	5	0	0	0	0	0	0	0	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	-	-	-	-	-
1/2	2	0	0	0	0	0	0	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	-	-	-	-	-
1/4	0	0	0	0	0	0	0	0	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	-	-	-	-	-
1/8	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	-	-	-	-	-
1/16	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	-	-	-	-	-
Kontr. 4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	-	-	-	-	-	-

Tab. 53: Hemmungstest mit der durch Aceton-Extraktion gewonnenen Emulsion Nr. 38 b aus Stroma I des Erythrocyten 243. - Das Reaktionsergebnis des Hemmungstests ist in Einheiten der Hemmungseigenschaft, das des Haemolysatests in Stärken des Haemolysgrades angegeben.

Tabelle 54

Lösung Titer	Antiseren										Kontrolle 5			Kont. 1			Kont. 2			Kont. 3		
	λ	γ_2	E^1	γ_2	F^1	F^{14}	F^{Kao}	F^{Ph}	F^{149}	F^{528}	U_2	I	C_2	X_2	γ_1	γ_2	L	S	Z	NaCl/Exy.	Kpl.	Lsg.
unverd.	0	0	0	0	0	0	5	5	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	-	-
1/2	0	0	0	0	0	0	5	5	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	-	-
1/4	0	0	0	0	0	0	5	5	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	-	-
1/8	0	0	0	0	0	0	2	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	-	-
1/16	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	-	-
Kontroll.	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	-	-	-

Tab. 54: Hemmungsversuch mit Lösung Nr. 39 a aus Stroma I des Erythrocyten 243. - Das Reaktionsergebnis im Hemmungsversuch ist in Einklang mit der Hemmungseigenschaft, das des Haemolyseversuchs in Stärken des Haemolyse-grades angegeben.

Tabelle 55

Lösung Titer	Antiseren										Kontrolle 5						Kont. 1			Kont. 2			Kont. 3		
	λ	γ_2	E^1	γ_2	F^{Pd}	F^{Kao}	F^{Ph}	F^{149}	F^{528}	U_2	I	C_2	X_2	γ_1	γ_2	L	S	Z	NaCl/Exy.	Kpl.	Lsg.				
unverd.	0	0	0	0	0	0	5	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	-	-				
1/2	0	0	0	0	0	0	5	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	-	-				
1/4	0	0	0	0	0	0	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	-	-				
1/8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	-	-				
Kontroll.	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	-	-	-				

Tab. 55: Hemmungsversuch mit Lösung Nr. 39 b aus Stroma I des Erythrocyten 243. - Das Reaktionsergebnis im Hemmungsversuch ist in Einklang mit der Hemmungseigenschaft, das des Haemolyseversuchs in Stärken des Haemolyse-grades angegeben.

Tabelle 56

Schweine- serum Titer	A	Y ₂	E' ₃	F _{Rd}	F _{Kan}	F _{Ph}	F ₁₄₉	F ₅₂₈	U ₂	I	C ₂	X ₂	V	J ₁	J ₂	L	S	Z	Kontr. 1		Kontr. 2	Kontr. 3
																			NaCl/Ery.	Kpl.	Schw.-serum	
1/3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	-	-	
1/6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	-	-	
Kontr. 4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4				

Tab. 56: Hemmungstest mit dem Schweineserum, das den Fraktionen des Erythrocyten 243 zugesetzt wurde. -
Das Reaktionsergebnis des Hemmungstests ist in Einheiten der Hemmungseigenschaft, das des
Haemolysate in Stärken des Haemolysates angegeben.

L E B E N S L A U F

Am 20. Mai 1926 wurde ich, Helga Beuche, Tochter des Ingenieur Alfred B e u c h e und seiner Ehefrau Gertrud, geb. Rehse in Königsberg/Pr. geboren.

Nach vierjähriger Grundschule und achtjähriger Oberschulzeit bestand ich im Februar 1944 an der Goethe-Oberschule in Königsberg/Pr. das Abitur. Durch direkte Kriegseinwirkung und deren Folgen wurde ich mehrere Jahre an einer weiteren Ausbildung gehindert.

Im Jahre 1948 erreichte ich die Zulassung zum Studium an der veterinärmedizinischen Fakultät der Humboldt-Universität Berlin, legte im Jahr 1950 die tierärztliche Vorprüfung ab und bestand im Winter 1953/54 das Staatsexamen an der Freien Universität Berlin-West. Nach Ableistung der Praktikantenzeit an der Rinderbesamungszentrale Neustadt/Aisch arbeitete ich dort im Laboratorium bis Juli 1956. Seit August 1956 bin ich am Tierärztlichen Institut der Universität Göttingen angestellt.

